

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von all-*trans*-Retinsäure (ATRA)  
auf die Expression von  
Differenzierungsmarkern bei humanen  
Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Friedrich Thienemann  
aus Heidenheim an der Brenz

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. B.M. Henz  
2. PD. Dr. med. B. Hermes  
3. PD. Dr. med. K. Hartmann

Datum der Promotion: 26. Juni 2006

Jenny und der Deutschen Elf

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Mastzellen .....</b>	<b>8</b>
1.1.1	Die Mastzelle – ein Überblick .....	8
1.1.2	Mastzellheterogenität .....	11
1.1.3	HMC-1 5C6 Zellen.....	12
1.1.4	LAD 2 Zellen.....	12
1.1.5	Kutane Mastzellen .....	13
1.1.6	Drei unterschiedliche Mastzellsysteme – eine Gegenüberstellung .....	13
<b>1.2</b>	<b>Mastzellmarker.....</b>	<b>13</b>
1.2.1	Der hochaffine IgE-Rezeptor FcεRI.....	13
1.2.2	Der SCF-Rezeptor c-kit .....	14
1.2.3	Tryptase.....	15
1.2.4	Chymase .....	16
1.2.5	Histamin und die Histidindecaboxylase.....	16
1.2.5.1	Histamin .....	16
1.2.5.2	Histidindecaboxylase .....	17
<b>1.3</b>	<b>Zytokine.....</b>	<b>17</b>
1.3.1	Interleukin-4.....	17
1.3.2	Interleukin-6.....	18
1.3.3	Nervenwachstumsfaktor-β.....	19
<b>1.4</b>	<b>All-trans-Retinsäure .....</b>	<b>20</b>
1.4.1	Überblick .....	20
1.4.2	Signaltransduktion.....	22
1.4.3	ATRA und die Hämatopoese .....	23
1.4.4	ATRA und die Mastzelle .....	25
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>29</b>

<b>3.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>29</b>
3.1.1	Technische Geräte.....	29
3.1.2	Verbrauchsmaterial.....	30
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	30
3.1.4	Zelllinien.....	31
3.1.5	Kits.....	32
3.1.6	Agentia.....	32
3.1.7	Antikörper .....	32
3.1.8	Puffer/Gel.....	33
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Steriltechnik .....	34
3.2.2	Zellkultivierung.....	34
3.2.2.1	HMC-1 5C6 Zellen in Kultur.....	34
3.2.2.2	LAD 2 Zellen in Kultur.....	34
3.2.2.3	KMZ in Kultur.....	35
3.2.3	Zellzahl, Morphologie, Vitalität und Reinheit.....	35
3.2.3.1	Handzählung .....	35
3.2.3.2	Automatisierte Zellzählung .....	35
3.2.4	Behandlung der Zellen.....	36
3.2.5	Erfassung der Apoptose .....	36
<b>3.3</b>	<b>Isolierung kutaner Mastzellen.....</b>	<b>37</b>
3.3.1	Erster Tag der Vorhautpräparation.....	37
3.3.2	Zweiter Tag der Vorhautpräparation.....	37
3.3.3	Dritter Tag der Vorhautpräparation.....	37
3.3.4	Qualitätskontrolle .....	39
<b>3.4</b>	<b>Durchflusszytometrie .....</b>	<b>39</b>
3.4.1	Qualitätskontrolle .....	40
3.4.2	Coulter Epics XL .....	40
3.4.3	Probenvorbereitung, Messung und Datenanalyse.....	41

<b>3.5</b>	<b>RT-PCR .....</b>	<b>43</b>
3.5.1	Grundlagen.....	43
3.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA.....	44
3.5.2.1	Zellyse.....	44
3.5.2.2	RNA-Extraktion und DNase-Verdau.....	44
3.5.2.3	Phenolisierung und Fällung .....	45
3.5.2.4	RNA-Reinheitsbestimmung und Quantifizierung.....	45
3.5.3	cDNA-Synthese.....	45
3.5.4	PCR.....	46
3.5.5	Agarosegel-Elektrophorese.....	49
<b>3.6</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der verwendeten Zellen.....</b>	<b>50</b>
4.1.1	Charakterisierung von HMC1-5C6 Zellen .....	50
4.1.2	Charakterisierung von LAD 2 Zellen .....	50
4.1.3	Charakterisierung von KMZ.....	51
<b>4.2</b>	<b>Einflüsse von IL-4, IL-6 und NGF-<math>\beta</math> auf HMC-1 5C6 Zellen .....</b>	<b>55</b>
4.2.1	Vorversuche: Einflüsse der Zytokine auf HMC-1 5C6 Zellen .....	55
4.2.2	Kinetikstudie: Einflüsse der Zytokine auf HMC-1 5C6 nach 24 Tagen .....	56
4.2.3	Quantifizierung der Einflüsse der Zytokine auf HMC-1 5C6 Zellen.....	58
4.2.4	Einfluss von IL-4 auf humane Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade.....	61
<b>4.3</b>	<b>Einfluss von ATRA auf humane Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade.....</b>	<b>64</b>
4.3.1	Einfluss von ATRA auf Proliferation und Überleben .....	64
4.3.2	Einfluss von ATRA auf die Expression von c-kit.....	66
4.3.3	Einfluss von ATRA auf die Expression der Tryptase.....	69
4.3.4	Einfluss von ATRA auf die Expression der Chymase .....	72
4.3.5	Einfluss von ATRA auf die Expression von Fc $\epsilon$ RI ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) .....	75
4.3.6	Einfluss von ATRA auf die Expression der Histidindecaboxylase .....	79

4.3.7	Zusammenfassender Überblick über die Effekte von ATRA .....	80
4.3.8	ATRA beeinflusst auf zweifache Weise die Expression von c-kit.....	83
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
5.1	IL-4, IL-6, NGF- $\beta$ ohne differenzierenden Effekt auf HMC-1 5C6 Zellen .....	86
5.2	Die intermediär differenzierten LAD 2 Zellen .....	89
5.3	IL-4 vermittelte Effekte sind abhängig vom Differenzierungsgrad.....	89
5.4	Der dedifferenzierende Einfluss von ATRA auf humane Mastzellen .....	91
5.5	Gegenüberstellung der Einflüsse von IL-4 und ATRA auf Mastzellen.....	98
	Synopsis.....	99
	Abkürzungsverzeichnis .....	101
	Literaturverzeichnis .....	103
	Danksagung .....	116
	Erklärung.....	117

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Mastzellen

### 1.1.1 Die Mastzelle – ein Überblick

Die im Bindegewebe vorkommende Mastzelle wurde erstmals 1879 von Paul Ehrlich gefärbt und beschrieben. Nach einer Toluidinblaufärbung stellten sich unter dem Mikroskop Zellen mit blau angefärbten intrazytoplasmatischen Granula dar. Aufgrund ihrer Präsenz im Bindegewebe vermutete Paul Ehrlich in diesen neuen Zellen eine ernährungsunterstützende Funktion und benannte sie Mastzellen, da sie mit ihren vielzähligen Einschlussgranula optisch einen gemästeten Eindruck auf ihn machten (Ehrlich 1879). Auch heute noch wird diese Anfärbbarkeit der zytoplasmatischen Granula der Mastzelle zu ihrer Identifizierung im Lichtmikroskop genutzt. Den Bekanntheitsgrad erlangte die Mastzelle durch ihre Schlüsselfunktion im allergischen Geschehen. Aber auch bei einer Vielzahl anderer physiologischer und pathologischer Prozesse spielt die Mastzelle wahrscheinlich eine entscheidende Rolle. Ihre Gesamtbedeutung ist trotz zahlreicher Untersuchungen erst punktuell geklärt, und viele ihrer Funktionen sind unklar und unter Wissenschaftlern umstritten. Zurückzuführen ist dies am ehesten auf ihr heterogenes Bild, das sie im menschlichen Körper zeichnet (Huntley *et al.* 1992, Weber *et al.* 1995). Dennoch ist heute klar, dass die Mastzelle eine wichtige Rolle bei der Initiation einer Immunantwort besitzt und funktionell eng mit anderen Immunzellen wie B- und T-Lymphozyten zusammenarbeitet (Henz *et al.* 2001).

Mastzellen sind eingebettet im Bindegewebe um Nerven, Blut- und Lymphgefäße zu finden. Vor allem kommen sie in der Haut, der Schleimhaut des Respirations- und Gastrointestinaltraktes sowie im Lymphgewebe und in der Peritonealflüssigkeit vor (Galli *et al.* 1999), ontogenetisch also überall dort, wo sich während der Embryogenese epitheliales Gewebe formiert (Henz *et al.* 2001). Die mittlere Mastzellendichte in menschlicher Haut liegt im Durchschnitt bei 5.000 bis 7.000 Mastzellen/mm<sup>3</sup> Haut, wobei die Dichte zwischen einzelnen Hautlokalisationen um den Faktor 20 variieren kann (Holgate 1996, Weber *et al.* 2003).

Ein wichtiger Meilenstein in der Mastzellforschung wurde im Jahr 1977 von Kitamura *et al.* gesetzt. Seine Arbeitsgruppe konnte an mastzelldefizienten W/W<sup>v</sup>-Mäusen (*white spotting*) beweisen, dass sich Mastzellen aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen nach Knochenmarktransplantation rekrutieren (Kitamura *et al.* 1978). Damit war die grobe Richtung der Mastzelldifferenzierung vorgegeben: Eine Vorläuferzelle hämatopoetischen Ursprungs verlässt das Knochenmark und wandert durch die Blutbahn in das Gewebe ein. Unter dem Einfluss zahlreicher Faktoren differenziert sie dort zur reifen Mastzelle, wie sie in dieser Arbeit aus Vorhäuten isoliert wurde (Kitamura *et al.* 1993). Seither wurde eine Vielzahl von Zytokinen



und Wachstumsfaktoren beschrieben, die direkt oder indirekt Einfluss auf die Differenzierung und das Wachstum von Mastzellen nehmen. Beschrieben wurden bis dato IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, NGF, SCF, TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  (Metcalf *et al.* 1997), wobei anzumerken ist, dass viele der Faktoren nur bei einigen Spezies oder Mastzellsubarten wirken.

Was zeichnet nun eine Mastzelle aus? Wo ist ihr Ursprung? Was sind ihre typischen Merkmale, Eigenschaften und Funktionen? Die Mastzelle ist zwischen 5 und 20  $\mu\text{m}$  im Durchmesser groß und lässt sich über ihre typische Granularität und den randständigen, unsegmentierten Zellkern, also ihre Ultrastruktur, identifizieren (Czarnetzki *et al.* 1995, Metcalfe *et al.* 1997). Im Gegensatz zu anderen Leukozyten differenziert die Mastzelle erst in peripherem Gewebe zur vollständig differenzierten Mastzelle. Sie entsteht im Humansystem aus CD34<sup>+</sup>-, c-kit<sup>+</sup>-, und CD13<sup>+</sup>-Vorläuferzellen und findet somit wie auch bei der Maus ihren Ursprung im Knochenmark (Kirshenbaum *et al.* 1999). Typische immunologische Marker sind der hochaffine IgE-Rezeptor und der SCF-Rezeptor c-kit (Ashman 1999, Hasegawa *et al.* 1999). In zytoplasmatischen Granula gespeicherte Mediatoren können nach Stimulation der Mastzelle freigesetzt werden. Mit diesen biologisch aktiven Substanzen nimmt die Mastzelle eine wichtige Funktion bei Entzündungsprozessen und allergischen Reaktionen ein (Tabelle 1). Außerdem werden bei der Mastzellaktivierung, beispielsweise über den IgE-Rezeptor, diverse weitere Mediatoren *de novo* synthetisiert, wozu Lipidmetaboliten und Zytokine zählen.

Am bekanntesten ist wohl die allergische Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp, wie die allergische Rhinitis oder das Asthma bronchiale (Galli & Wershil 1996), aber auch bei allergischen Reaktionen vom verzögerten Typ, wie zum Beispiel der Kontaktdermatitis, sind Mastzellen von Bedeutung (Torii *et al.* 1993). Zudem besitzen sie auch die Fähigkeit zur Phagozytose und Antigenpräsentation (Malaviya & Georges 2002), Expression von Adhäsionsmolekülen und Lymphozytenaktivierung, Produktion von chemotaktischen Faktoren und Stimulation der Lymphozytenmigration (Henz *et al.* 2001). Aufgrund der Verteilung von Mastzellen um Blutgefäße wird ihnen auch eine vasoaktive Komponente zugesprochen (Metcalf *et al.* 1997, Grutzkau *et al.* 1998). Seit kurzem ist bekannt, dass Mastzellen im Endstromgebiet des Gefäßsystems, das beispielsweise bei Sepsis besonders gestört sein kann, eine protektive Funktion einnehmen, und Mastzellproteasen die Homöostase dort aufrechterhalten. Damit erhält die Mastzelle eine zusätzliche Eigenschaft und optimiert das Zusammenspiel der Immunzellen im Kampf gegen bakterielle und parasitäre Infektionen (Maurer *et al.* 2003, 2004).

Tabelle 1: Überblick über Mastzellmediatoren. Präformierte und *de novo* synthetisierbare Faktoren der Mastzelle, deren Freisetzung nach adäquater Stimulation erfolgt (Tabellarische Zusammenfassung aus Metcalfe *et al.* 1997). Viele der Faktoren werden nur von bestimmten Mastzellsubarten gebildet.

Mediatoren der Mastzelle	
Biogene Amine	Histamin Serotonin (Maus)
Neutrale Proteasen	Chymase Tryptase Carboxypeptidase A
Saure Hydrolasen	$\beta$ -Hexosaminidase $\beta$ -Glucuronidase $\beta$ -D-Galactosidase
Oxidative Enzyme	Superoxid-Dismutase Peroxidase
Proteoglykane	Heparin Chondroitinsulfat E
Zytokine (präformiert)	TNF- $\alpha$
Chemotaktische Faktoren	ECF NCA
Lipidmediatoren (de novo)	Lipoxygenaseprodukte (HPETEs, HETEs, Leukotriene) Cyclooxygenaseprodukte (Prostaglandine, Thromboxan) Thrombozyten aktivierender Faktor
Zytokine (de novo) (werden nach Aktivierung exprimiert)	GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 bis IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, TCA-3, TNF- $\alpha$ u.a.

### 1.1.2 Mastzellheterogenität

Die morphologischen, biochemischen und funktionellen Eigenschaften der Mastzelle beschreiben ein heterogenes Bild. Der Phänotyp der Mastzelle variiert mit der Umgebung im menschlichen Körper und dessen Immunsituation. So unterscheiden sich Mastzellen in Größe, Ultrastruktur, histochemischen Eigenschaften, quantitativem Gehalt an Mediatoren, Sensitivität gegenüber Stimulation (Irani & Schwartz 1994) und Beeinflussbarkeit durch Medikamente (Forsythe & Ennis 2000). Eine Mastzelle in der Nähe einer akuten oder chronischen Entzündung kann gegenüber einer Mastzelle im gesunden Gewebe verändert sein (Beil *et al.* 2000). Weiter unterscheiden sich Mastzellen in der Haut von Mastzellen in den Alveolarsepten der Lunge, der Mukosa und Submukosa des Intestinums und in Lymphstrukturen (Church & Clough 1999). Entscheidend für die gewebespezifische Mastzellheterogenität ist dabei die Verteilung von proteolytischen Enzymen im Zytoplasma, nach der die zwei wichtigsten Mastzellkategorien unterschieden werden. Die ursprüngliche Aufteilung entstammte dem murinen System, in dem man mukosale Mastzellen (*Mucosal Mast Cell*, MMC) von Bindegewebsmastzellen (*Connective Tissue Mast Cell*, CTMC) trennt. MMC findet man überwiegend in der Lamina propria des Dünndarms, während CTMC vorwiegend in der Haut und Peritonealflüssigkeit aufzufinden sind (Enerback 1986). Humane Mastzellen unterscheidet man am Gehalt neutraler Proteasen. Der Mastzelltyp MC<sub>TC</sub> (*Mast Cell*<sub>Tryptase Chymase</sub>) verfügt über Granula mit Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase A und Cathepsin G, während der Typ MC<sub>T</sub> (*Mast Cell*<sub>Tryptase</sub>) nur Granula mit Tryptase aufweist. Das Verteilungsmuster der beiden Mastzelltypen ist dabei gewebespezifisch. Der MC<sub>TC</sub>-Typ ist überwiegend in der Haut und der intestinalen Submukosa zu finden, wohingegen der MC<sub>T</sub>-Typ typischerweise in den Alveolarsepten des Lungenparenchyms und der intestinalen Mukosa vorherrscht (Irani & Schwartz 1994).

Um Mastzeleigenschaften und Charakteristika zu untersuchen, stehen mehrere Modellsysteme zur Verfügung, in denen sich die Heterogenität ebenfalls widerspiegelt. Untersuchungen zu reifen (differenzierten) Mastzellen werden entweder mit kutanen Mastzellen (KMZ), beispielsweise aus Vorhaut- oder Brusthautgewebe, oder mit Mastzellen aus Lungengewebe, der Nasen- oder Dünndarmschleimhaut durchgeführt. Häufig werden Mastzellen zusätzlich zu den genannten Systemen für Untersuchungszwecke auch aus undifferenzierten, pluripotenten Zellen generiert, die man beispielsweise aus Knochenmark oder Nabelschnurblut gewinnt. Der Forschung stehen zudem als weitere Mastzellmodelle drei humane Zelllinien zur Verfügung. Dabei handelt es sich um die Linien HMC-1 Zellen (Butterfield *et al.* 1988), deren Subklon HMC-1 5C6 Zellen (Weber *et al.* 1996) und LAD 1 und 2 Zellen (Kirshenbaum *et al.* 2003), die ein beinahe unerschöpfliches Reservoir an (unreifen) Mastzellen bieten.

### 1.1.3 HMC-1 5C6 Zellen

Erstmals im Jahr 1988 konnte aus dem Blut einer an Mastzelleukämie erkrankten Frau eine Mastzelllinie etabliert werden. Diese HMC-1 genannte Zelllinie repräsentiert ein sehr unreifes Mastzellstadium. Nachweislich verfügt sie in ihren Granula über Histamin, Tryptase und Chloracetatesterase, lässt sich mit Toluidinblau schwach färben, besitzt aber keinen funktionellen, hochaffinen IgE-Rezeptor (Butterfield *et al.* 1988, Hamann *et al.* 1994, Nilsson *et al.* 1994a). Zwei Punktmutationen in c-kit bewirken dessen konstitutive Phosphorylierung und eine damit verbundene Autoaktivierung. Aufgrund dessen proliferieren HMC-1 Zellen in Kultur ohne rhSCF Zusatz (Furitsu *et al.* 1993). Obwohl HMC-1 5C6 Zellen nicht alle typischen Mastzellcharakteristika aufweisen, stehen sie doch in enger Beziehung zu humanen Mastzellen und sind seitdem ein hervorragendes Modell für die Mastzellforschung (Agis *et al.* 1996).

Fast zehn Jahre später, 1995, generierte die Arbeitsgruppe unter Frau Professor Henz aus der ursprünglichen HMC-1 Zelllinie mit limitierter Verdünnung einen weiteren Mastzellklon. Der HMC-1 Subklon HMC-1 5C6 präsentierte sich als ein weiter differenziertes Mastzellstadium als die parentale HMC-1 Zelllinie und war mit zusätzlichen Mastzellcharakteristika ausgestattet. Im Vergleich zur HMC-1 Zelllinie verfügt der Subklon 5C6 über einen funktionellen, hochaffinen IgE-Rezeptor und exprimiert dessen  $\alpha$ -Kette wenn auch die Expression relativ schwach ist. Im Gegensatz zum Histamingehalt, der sich bei beiden Zelllinien ähnelt, ist die Tryptaseaktivität bei HMC-1 5C6 Zellen gesteigert und die Toluidinblauanfärbbarkeit über 90% im Vergleich zu 20% bei HMC-1 Zellen. Gleichwohl ist in beiden Fällen die Farbtintensität schwach (Weber *et al.* 1996). Zusammenfassend stellen HMC-1 5C6 Zellen im Vergleich zu HMC-1 Zellen eine stärker differenzierte und homogenere Zelllinie in der Mastzellentwicklung dar und sind somit für die meisten Fragestellungen als Modellsystem geeigneter als ihre parentalen Zellen.

### 1.1.4 LAD 2 Zellen

Während die vorliegende Arbeit entstand, wurde von einem Patienten mit aggressivem Mastzellsarkom eine weitere Zelllinie etabliert, die in serumfreiem Medium kultiviert werden konnte und LAD 2 Zellen benannt wurden. Im Gegensatz zu HMC-1 5C6 Zellen besitzen diese LAD 2 Zellen keine aktivierende Mutation des c-kit Gens und benötigen den Zusatz von rhSCF zur Proliferation (Kirshenbaum *et al.* 2003). LAD 2 Zellen stellen ein intermediär differenziertes Reifestadium zwischen HMC-1 5C6 Zellen und KMZ dar und besitzen einen höheren Gehalt an Histamin und Tryptase als HMC-1 5C6 Zellen. Zusätzlich sind LAD 2 Zellen Chymase-positiv (auf mRNA-Ebene) und exprimieren in hohem Maße Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ , wesentlich höher als HMC-1 5C6 Zellen (Jensen *et al.* 2005).

### 1.1.5 Kutane Mastzellen

Kutane Mastzellen (KMZ) müssen aus der Haut durch ein aufwendiges Verfahren isoliert werden und vermehren sich nicht in Kultur. Sie repräsentieren das Endstadium der Differenzierung und weisen die typischen Mastzellcharakteristika auf, die im obigen Teil bereits beschrieben wurden (siehe Kapitel 1.1.1). KMZ lassen sich mit starker Intensität Toluidinblau anfärben, haben einen hohen Gehalt an Tryptase, Chymase und Histamin und weisen einen funktionellen IgE-Rezeptor auf (Henz *et al.* 2001, Babina *et al.* 2004).

### 1.1.6 Drei unterschiedliche Mastzellsysteme – eine Gegenüberstellung

Mit den oben beschriebenen Mastzelltypen stehen unserem Labor drei Mastzellmodelle zu Forschungszwecken zur Verfügung. Die zwei Zelllinien HMC-1 5C6 und LAD 2 sind von ihrem Phänotyp her betrachtet unreife Mastzellen, wobei aufgrund ihrer Eigenschaften HMC-1 5C6 Zellen noch wesentlich unreifer und undifferenzierter als LAD 2 Zellen sind. Die Tatsache, dass LAD 2 Zellen eine intermediäre Entwicklungsstufe in der Mastzelldifferenzierung einnehmen, ermöglicht Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit der Mastzelle in drei unterschiedlichen Differenzierungsphasen. Mittels dieser drei Modelle und anhand ihrer Mastzellmarker konnte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Faktoren positiven oder negativen Einfluss auf die Mastzellentwicklung haben und differenzierend (oder dedifferenzierend) wirken.

## 1.2 Mastzellmarker

Bei der Phänotypisierung der Mastzelle sind typische Charakteristika von entscheidender Bedeutung. Sie werden als Mastzellmarker zusammengefasst. Anhand der Expression dieser Marker können die zu untersuchenden Mastzellen beschrieben und Veränderungen festgestellt werden. Dies geschieht entweder über den Nachweis eines Proteins auf der Zelloberfläche, im Zytoplasma oder über die Darstellung der mRNA. Außerdem kann man Rezeptoren und Mediatoren einer Aktivitätsprüfung unterziehen oder die Antwort auf einen Stimulus untersuchen. Wichtige Marker der Mastzellen sind der hochaffine IgE-Rezeptor FcεRI, der SCF-Rezeptor c-kit, die in zytoplasmatischen Granula gespeicherten Endoproteasen Tryptase und Chymase sowie das biogene Amin Histamin.

### 1.2.1 Der hochaffine IgE-Rezeptor FcεRI

Der hochaffine IgE-Rezeptor FcεRI wird von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, Langerhanszellen, Monozyten, Thrombozyten und Megakaryozyten intrazellulär oder auf der Zelloberfläche exprimiert, ist bei den beiden ersten Zellen aber am höchsten

(Hasegawa *et al.* 1999). Dabei kommt dem Rezeptor bei der Vermittlung allergischer Prozesse eine entscheidende Rolle zu. Durch eine Quervernetzung der IgE-Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit IgE-Antikörpern und dem multivalenten Allergen werden die Zellen aktiviert. Es folgt die Sekretion von Mediatoren, die klinisch bis zum anaphylaktischen Schock führen können (Dombrowicz *et al.* 1993).

Der als tetramere Struktur aufgebaute Rezeptor besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten, einer  $\alpha$ -Kette, einer  $\beta$ -Kette und zwei über Disulfidbrücken verbundenen  $\gamma$ -Ketten (Blank *et al.* 1989, Kinet 1999). Die  $\alpha$ -Kette wird auf der Zelloberfläche exprimiert und ist ausreichend für eine IgE-Bindung (Hakimi *et al.* 1990), während die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten intrazellulär lokalisiert und für die Signaltransduktion verantwortlich sind. Die  $\gamma$ -Kette des IgE-Rezeptors ist auch mit dem IgG-Rezeptor Fc $\gamma$ RI assoziiert (Scholl & Geha 1993). Die  $\beta$ -Kette ist nicht immer nachweisbar und für die Funktionalität des Fc $\epsilon$ RI-Rezeptors nicht obligatorisch, obgleich signalverstärkend.

### 1.2.2 Der SCF-Rezeptor c-kit

Der Stammzellfaktor (*Stem Cell Factor*, SCF) ist der Ligand für den SCF-Rezeptor c-kit und ordnet sich als CD117 in die Liste der *Cluster of Differentiation* (CD) ein. c-kit (kit steht für die englische Bezeichnung *kitten* – das Kätzchen) ist das zelluläre Homolog des Onkogens v-kit, das 1986 in dem Katzensarkomvirus HZ4 nachgewiesen und isoliert wurde (Besmer *et al.* 1986). Der SCF-Rezeptor wird von Mastzellvorläufern und reifen Mastzellen exprimiert und ist essentiell für die Entwicklung von Erythrozyten, Melanozyten, interstitiellen Cajal-Zellen und Keimzellen im besonderen. Damit ist der SCF-Rezeptor auch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen vorhanden und für deren Differenzierung unabdingbar (Ashman 1999, Kitamura & Hirotab 2004). Bei Mastzellen fördert SCF nicht nur die Differenzierung sondern bewirkt auch eine Aktivierung und moduliert die Degranulation, induziert Chemotaxis und Mastzelladhäsion und stimuliert bei Mastzellvorläufern die Proliferation (Grabbe *et al.* 1994). SCF ist der wichtigste Mediator, der das Wachstum und die Differenzierung humaner Mastzellen *in vitro* sowie *in vivo* fördert (Irani *et al.* 1992, Valent *et al.* 1992, Mitsui *et al.* 1993, Costa *et al.* 1996). Die intrazelluläre Domäne von c-kit verfügt über eine Tyrosinkinaseaktivität (Rezeptor-Tyrosin-Kinase). Die Stimulierung durch den Liganden SCF führt zu einer ligandeninduzierten Dimerisierung des Rezeptors gefolgt von intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Diese bewirkt eine Phosphorylierung des c-kit-Rezeptors selbst, wodurch Signaltransduktionsprozesse in Gang gesetzt werden, von denen bis heute noch nicht alle bekannt sind (Ronnstrand 2004). Im allgemeinen werden aber durch Phosphorylierung von Tyrosinresten Proteine direkt aktiviert, die Zellwachstum und Differenzierung induzieren (Stryer 1996). Im besonderen seien die Signaltransduktionskaskaden JAK/STAT und Ras/Erk zu nennen. Bei ersterer werden durch

Phosphorylierung die Janus-Kinasen (JAK) aktiviert, die dann wiederum durch weitere Phosphorylierung STAT-Proteine (*Signal Transducers and Activators of Transcription*, STAT) aktivieren. STAT-Proteine sind Transkriptionsfaktoren mit DNA-Bindungsstellen, die durch Dimerisierung im Zellkern die Genexpression regulieren. Am bekanntesten ist die Ras/Erk-Kaskade bestehend aus einer konsekutiven Aktivierung der Kinasen Raf-1, Mek1 und Mek2, und schließlich Erk1, Erk2 und MAPK p38 (mitogen-aktivierte Proteinkinase, *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Die Erks dimerisieren im Nukleus und beeinflussen die Gentranskription. Bei der Signaltransduktion über den c-kit-Rezeptor spielt neben der Ras/Erk-Kaskade auch die PI3-Kinase und die von ihr aktivierte Proteinkinase B eine wichtige Rolle. Durch diese Kaskaden nimmt c-kit Einfluss auf Proliferation und Differenzierung von Mastzellen. Eine Mutation des c-kit-Gens kann entweder zu einem Funktionsverlust der Tyrosinkinaseaktivität oder zu deren Überaktivierung führen. Die Folge ist entweder eine totale Zelldepletion oder Tumorstadium (Ronnstrand 2004), weswegen solche Mutationen bei Onkogenen zu finden sind. Eine c-kit-Mutation ist in den interstitiellen Cajal-Zellen die Ursache für die Entstehung von gastrointestinalen Stromazelltumoren. Im Jahr 1998 wurde dieser Zusammenhang entdeckt, c-kit wurde zum Tumormarker und die Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib Mesylat (Gleevec/Glivec von Novartis) vielversprechend (Heinrich & Corless 2005). Heute ist Gleevec/Glivec für die Therapie der chronischen myeloischen Leukämie (CML) und von gastrointestinalen Stromazelltumoren zugelassen (Rote Liste 2005).

Eine c-kit-Mutation kann aber auch zu anderen Tumoren wie dem testikulären Keimzelltumor, der akuten myeloischen Leukämie (AML) und der Mastozytose führen (Akin & Metcalfe 2004). Bei der Kultivierung humaner Mastzellen ist zu berücksichtigen, dass humane Mastzellen, sofern sie keine c-kit-Mutation besitzen, rhSCF-abhängig in Medium kultiviert werden müssen wie beispielsweise LAD 2 Zellen (Kirshenbaum *et al.* 2003). HMC-1 Zellen proliferieren hingegen ohne den Zusatz des Wachstumsfaktors SCF (Butterfield *et al.* 1988, Nilsson *et al.* 1994a). Die aus humanem Gewebe isolierten Mastzellen können mit rhSCF deutlich länger in Kultur gehalten werden.

### 1.2.3 Tryptase

Die Tryptase ist eine mastzellspezifische Serinendoprotease und wird in intrazytoplasmatischen Granula gespeichert (Schwartz 2001). Die Sekretion der Tryptase im Zuge der Degranulation ist charakteristisch für allergische Reaktionen. Somit dient die Tryptase als Allergiemarker (Payne & Kam 2004) und ist bei der Mastozytose ein wichtiger Verlaufssparameter (Schwartz 2001). Eine wichtige Funktion wird der Tryptase auch bei Entzündungsprozessen und der Immunantwort zugesprochen (Steinhoff *et al.* 2005), doch nicht alle Funktionen der Tryptase sind geklärt. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Tryptase den Protease-aktivierten Rezeptor Typ 2

(*Protease Activated Receptor*, PAR) aktiviert. Die Signaltransduktion erfolgt über das ‚Triggern‘ eines G-Proteins, da PAR-2 an dieses gekoppelt ist (Barnes *et al.* 2004). Über die PAR-2-Rezeptoren kann die Tryptase im kardiovaskulären, pulmonalen und gastrointestinalen System sowohl Einfluss auf Entzündungsprozesse nehmen als auch die Nozizeption beeinflussen (Coelho *et al.* 2003). Damit hat die Tryptase – und somit die Mastzelle – eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen in diesen Körperregionen.

#### 1.2.4 Chymase

Die Chymase ist die zweite Serinendoprotease der Mastzelle und wird ebenfalls in zytoplasmatischen Granula gespeichert (Welle 1997). Im Gegensatz zur Tryptase ist die Chymase – soweit dies bisher bekannt ist – nicht an immunologischen Prozessen direkt beteiligt. Ihre Wirkungsweise ähnelt sehr stark der des Enzyms ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*); Chymase kann auch Angiotensin I in die vaskulär hochwirksame Substanz Angiotensin II umsetzen. Dadurch spielt das Enzym eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Urtikaria, Kardiomyopathien und des Herzversagens (Doggrell & Wanstall 2004). Es wird vermutet, dass die Chymase am Umbauprozess der extrazellulären Matrix beteiligt ist und dadurch die Kardiomyopathie unterhält oder aggraviert (Unger & Li 2004). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur Tryptase ist sie auch Ligand der Rezeptorfamilie PAR und aktiviert den Rezeptor PAR-1 (Schechter *et al.* 1998, Reed & Kita 2004).

#### 1.2.5 Histamin und die Histidindecaboxylase

##### 1.2.5.1 Histamin

Histamin ist wohl der bekannteste Mediator der Mastzelle und spielt die Hauptrolle bei allergischen Reaktionen vom Soforttyp (Typ I). Die Histaminausschüttung erfolgt nach Antigenkontakt und IgE-Quervernetzung auf der Mastzelloberfläche (siehe Kapitel 1.2.1) mit immunmodulatorischer und vasoaktiver Wirkung (Jutel *et al.* 2002). Bei der Reaktion vom Soforttyp führt Histamin zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur, vorwiegend des Respirationstraktes, und ist somit Hauptverursacher des Asthma bronchiale. Daneben ist Histamin auch ein Neurotransmitter mit inhibitorischer und exzitatorischer Wirkung und kann in höherer Konzentration im Hypothalamus gefunden werden. Es wirkt auf spezielle Rezeptoren, die als Histaminrezeptoren bezeichnet werden und sich in vier Gruppen (H<sub>1</sub> bis H<sub>4</sub>) untergliedern. Der H<sub>1</sub>-Rezeptor ist an entzündlichen und immunmodulatorischen Prozessen beteiligt. Über den H<sub>2</sub>-Rezeptor wird die Säureproduktion des Magens reguliert und eine Immunsuppression in Leukozyten über die meist inhibitorisch wirkende cAMP-Kaskade verursacht. Den H<sub>3</sub>-Rezeptor findet man hauptsächlich im zentralen Nervensystem, wo er bei



der Regulierung des Wachzustandes und der Aufmerksamkeit, sowie bei weiteren Grundfunktionen eine wichtige Rolle spielt (Silbernagl & Lang 1998, Klinke & Silbernagl 2003, Jablonowski *et al.* 2004). Der kürzlich entdeckte H<sub>4</sub>-Rezeptor hat vermutlich bei Allergien und bei Asthma bronchiale eine bedeutende Funktion (Fung-Leung *et al.* 2004).

#### 1.2.5.2 Histidindecarboxylase

Histamin entsteht aus der Aminosäure L-Histidin nach Decarboxylierung mittels des Enzyms L-Histidindecarboxylase (HDC) (Shore 1971, Moya-Garcia *et al.* 2005). Anhand der Expression der HDC kann ein indirekter Rückschluss auf die Histaminsynthese und auf die Histaminkonzentration gezogen werden und ist somit bei Untersuchungen zu Histamin geeignet (Watanabe & Ohtsu 2002). Mit Hilfe von HDC-KO-*(knock-out)*-Mäusen konnte zugleich gezeigt werden, dass der Histamingehalt in Zusammenhang mit der Mastzellproliferation und ihrer Differenzierung steht (Watanabe 2001).

### 1.3 Zytokine

Zytokine sind Proteine oder Peptide, die zur interzellulären Kommunikation beitragen, und vor allem von Zellen des Immunsystems gebildet werden. Bis heute sind mehr als 25 verschiedene Interleukine sowie weitere Zytokine mit den zugehörigen Rezeptoren charakterisiert worden. Sie wirken hauptsächlich lokal, können sich aber auch über die Blutbahn ausbreiten und systemische Wirkung entfalten. Dadurch sind sie an einer Vielzahl – wahrscheinlich sogar an allen – Immunprozessen direkt beteiligt. Zytokine nehmen eine Schlüsselrolle bei der Immunzellrekrutierung und Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Ausbildung einer speziellen Immunfunktion ein. Die Interleukine IL-4 und IL-6 sowie der Nervenwachstumsfaktor NGF- $\beta$  nehmen dabei in unterschiedlich starkem Umfang Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Mastzelle.

#### 1.3.1 Interleukin-4

Interleukin-4 (IL-4) wird von T-Helferzellen Typ-2 (T<sub>H</sub>2-Zellen), basophilen Granulozyten und Mastzellen unter speziellen Bedingungen produziert und gilt als klassisches T<sub>H</sub>2-Zytokin. Es aktiviert und rekrutiert wichtige Bestandteile des Immunsystems, nimmt maßgeblich Einfluss auf die humorale Immunantwort über eine Aktivierung von B-Zellen und führt dadurch zur Produktion von IgE und IgG1. Außerdem aktiviert IL-4 T-Zellen und initiiert die Migration eosinophiler Granulozyten (Steinke 2004). Diese IL-4-vermittelten Prozesse werden über den Rezeptorkomplex IL-4R/IL-13R gesteuert, indem IL-4 an die Rezeptorkette IL-4R $\alpha$  bindet

(Mueller *et al.* 2002). IL-4R $\alpha$  wird hauptsächlich von Mastzellen, Monozyten, Fibroblasten, hämatopoetischen Stammzellen, eosinophilen Granulozyten, B-Zellen und T-Zellen exprimiert (Chatila 2004). Durch den Einfluss von IL-4 auf die IgE-Produktion, Fc $\epsilon$ RI-Expression und Eosinophilenmigration steuert es die entzündliche Komponente des Asthma bronchiale. Eine Antagonisierung des IL-4-Rezeptors kann möglicherweise einen Durchbruch in der Asthmatherapie bringen. Darüber hinaus scheint IL-4 auch bei der Progression einer chronischen Tuberkuloseinfektion eine wichtige Rolle zu spielen (Rook *et al.* 2004).

Da Mastzellen keine homogene Zellpopulation darstellen (siehe Kapitel 1.1.2), sind auch die Effekte von IL-4 auf die Mastzelle unterschiedlich. Die Effekte unterscheiden sich sowohl innerhalb der verschiedenen Spezies als auch innerhalb der Mastzellsubarten, letzteres in Abhängigkeit von der Lokalisation im Körper (Metcalf *et al.* 1997). Die wichtigen Funktionen von IL-4 in Bezug auf die Mastzelle sind die Beeinflussbarkeit der Proliferation und Differenzierung und die Hochregulation des IgE-Rezeptors, wie nachfolgend ausgeführt wird.

Bei humanen intestinalen Mastzellen kann IL-4 die Proliferation positiv beeinflussen, sofern rhSCF anwesend ist. So kann IL-4 bei annähernd reifen Mastzellen die Fähigkeit zur Induktion der Zellteilung beibehalten (Bischoff *et al.* 1999, Lorentz & Bischoff 2001). Bei *in vitro* gezüchteten humanen Mastzellen aus Nabelschnurblut besitzt IL-4 einen antiproliferativen Effekt (Lora *et al.* 2003) und kann die Mastzellreifung durch verstärkte Synthese beider Serinendoproteasen Trypsin und Chymase fördern (Toru *et al.* 1998). Dies steht im Einklang mit weiteren Studien, die darauf hinweisen, dass in einem wenig reifen Mastzellstadium differenzierende Eigenschaften i. d. R. überwiegen (Nilsson & Nilsson 1995, Xia *et al.* 1997, Ryan *et al.* 1998). IL-4 kann je nach Bedingungen einerseits die Reifung fördern andererseits aber auch Apoptose induzieren (Oskeritzian *et al.* 1999). Unreife Mastzellen und Mastzellvorläufer sind im Gegensatz zu reifen, differenzierten Mastzellen durch IL-4 stärker beeinflussbar (Nilsson *et al.* 1994b).

### 1.3.2 Interleukin-6

Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) wird vornehmlich von T-Zellen, Makrophagen und Monozyten gebildet und beeinflusst die Immunantwort und Entzündungsreaktionen (Nishimoto & Kishimoto 2004). IL-6 ist wichtiger Mediator der Akute-Phase-Reaktion und induziert in der Leber die Synthese und Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen (Geiger *et al.* 1988). IL-6 hat dadurch einen großen Stellenwert im Heilungsprozess von Traumen und Verbrennungen. Wichtig ist die Funktion von IL-6 als Differenzierungsfaktor von B-Zellen und Aktivator von T-Zellen. Damit kommt dem IL-6 eine additive oder synergistische Wirkung mit dem IL-4 zu, wobei die IgG-Synthese weiter gesteigert und die Sekretion initiiert werden kann. Pathophysiologisch gesehen

wird IL-6 dadurch zum Wachstumsfaktor humaner Myelome – Tumore, die eine massive Immunglobulinproduktion zur Folge haben können (Kallen *et al.* 1999). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Beteiligung von IL-6 an atherosklerotischen Umbauprozessen durch Unterhaltung der Akute-Phase-Reaktion. Damit ist IL-6 als Risikofaktor koronarer Herzkrankheiten identifiziert (Song & Schindler 2004). Eine Überproduktion von IL-6 ist Mitverursacher chronisch-entzündlicher Erkrankungen. In diesem Zusammenhang sollen vor allem rheumatische Arthritiden und Morbus Crohn genannt werden (Nishimoto & Kishimoto 2004).

Für Untersuchungen an Mastzellen werden mononukleäre CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Nabelschnurblut mit Zytokinzusatz zu Mastzellen differenziert. Bei diesem Prozess ist IL-6 neben SCF ein wichtiger Differenzierungsfaktor (Saito *et al.* 1995, Kirshenbaum *et al.* 1999). IL-6 scheint bei dieser Art Mastzellen aber auch ambivalente Wirkungen zu entfalten. So führte IL-6 zu einer verminderten Expression von c-kit mit gleichzeitiger Zunahme der Zellgröße (Durchmesser); gleichzeitig konnten die Chymaseanfärbbarkeit und der Histamingehalt gesteigert werden (Kinoshita *et al.* 1999). In einer anderen Studie konnte die Apoptoseinduktion durch IL-4 mit IL-6 aufgehoben werden (Oskeritzian *et al.* 1999). Durch adäquate Stimulation sind humane Mastzellen in der Lage, auch IL-6 selbst zu produzieren und zu speichern (Kruger-Krasagakes *et al.* 1996), wobei sich die Produktion von IL-6 in Mastzellen durch IL-4 bedingt blockieren lässt (Lorentz *et al.* 2000, Babina *et al.* 2004).

### 1.3.3 Nervenwachstumsfaktor- $\beta$

Der Nervenwachstumsfaktor- $\beta$  (*Nerve Growth Factor- $\beta$* , NGF- $\beta$ ) gehört zur Gruppe der neurotrophen Hormone. Ursprünglich wurde diesem hochmolekularen Peptid allein eine Funktion bei Wachstum und Differenzierung neuronaler Zellen zugedacht. Neuerdings weiß man auch von einer Beteiligung an immunologischen Prozessen insbesondere bei Entzündungen (Lambiase *et al.* 2004). Beim Asthma bronchiale beispielsweise verursacht NGF- $\beta$  mitunter die Leukozytenmigration in die Mukosa des bronchialen Gewebes und aktiviert Entzündungszellen (Frossard *et al.* 2004). Zwei Rezeptoren stehen NGF- $\beta$  als Andockstellen für die Signaltransduktion zur Verfügung. Den Tyrosinkinase-Rezeptor TrkA und den Tumornekrose-Faktor-Rezeptor p75NTR, als Neurotrophinrezeptoren zusammengefasst, findet man jedoch nicht nur auf Zellen des neuronalen Systems und des Immunsystems sondern auch auf Brustkrebszellen. Dadurch beeinflusst NGF- $\beta$  die Proliferation und das Wachstum dieser malignen Zellen auf positive Weise – ein weiterer möglicher Angriffspunkt bei der Antitumorthherapie (Dolle *et al.* 2004). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer ließen sich Veränderungen der NGF- $\beta$ -Konzentration feststellen. Ähnliche Veränderungen konnte man auch bei der diabetischen Neuropathie

nachweisen (Lad *et al.* 2003, Pittenger & Vinik 2003). Diese Alteration war abhängig von der Progression der Erkrankung (Lorigados-Pedre & Bergado-Rosado 2004). NGF- $\beta$  greift auch in das sensorische System ein und scheint Einfluss auf die Nozizeption zu nehmen (Petruska & Mendell 2004).

Auch auf Mastzellen konnte ein Einfluss von NGF- $\beta$  nachgewiesen werden. So konnte bei Untersuchungen an Mastzellen aus Nabelschnurblut gezeigt werden, dass NGF- $\beta$  einen synergistischen Effekt mit SCF auf das Überleben der Zellen hat und die Apoptoserate vermindert (Kanbe *et al.* 2000). Bei der Mastzelllinie HMC-1 verursacht NGF- $\beta$  eine Hochregulation von Fc $\epsilon$ RI, Tryptase und Histamin (Welker *et al.* 1998). Dieser positive Effekt auf die Tryptaseaktivität und den Histamingehalt bei HMC-1 Zellen konnte nachfolgend bestätigt werden (Groneberg *et al.* 2005). Auch bei humanen Mastzellen aus Nabelschnurblut konnte für NGF- $\beta$  ein positiver Einfluss auf die Mastzellmarker nachgewiesen werden (Welker *et al.* 2000). NGF- $\beta$  scheint somit in der Regel differenzierende Eigenschaften auf Mastzellen zu besitzen.

## **1.4 All-trans-Retinsäure**

### **1.4.1 Überblick**

All-*trans*-Retinsäure (ATRA, Tretinoin) ist neben 9-*cis*-Retinsäure (9cRA, Isotretinoin) ein natürlicher Abkömmling des Vitamin A (Retinol, C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O) und gehört zu der Gruppe der Retinoide. Diese aktiven Metaboliten sind Oxidationsprodukte des Vitamin A und entstehen im menschlichen Körper aus dem *per os* aufgenommenen Provitamin A (Beta-Carotin). Durch die beiden Enzyme Retinoldehydrogenase (ROLDH) und Retinaldehydrogenase (RALDH) wird ATRA aus Vitamin A oxidativ hergestellt. In Primaten wird ATRA hauptsächlich zu 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure metabolisiert (Petkovich 2001).

Retinoide spielen im menschlichen Körper eine essentielle Rolle bei der Zellproliferation sowie bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen und somit im besonderen bei der Embryogenese (Maden 2000). Retinoidrezeptoren befinden sich im Zellkern und gehören zu der Superfamilie nukleärer Rezeptoren. Auf diese Weise entfalten Retinoide ihre hormonelle Wirkung direkt auf nukleärer Ebene und greifen in die Genexpression ein. Mehr als 530 Gene wurden in der Literatur bereits als direkte oder indirekte Ziele der Retinsäure beschrieben (Balmer & Blomhoff 2002).

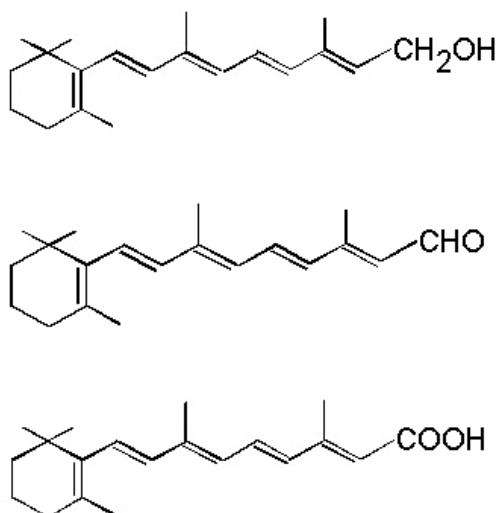


Abbildung 1: Synthese der all-*trans*-Retinsäure (ATRA). Vitamin A (oben) wird durch das Enzym Retinoldehydrogenase (ROLDH) zu Retinal (Mitte) umgesetzt. Mit Hilfe der Retinaldehydrogenase (RALDH) entsteht dann das Retinoidderivat ATRA (unten).

ATRA war das erste künstlich hergestellte Retinoid, gefolgt von Isotretinoin und anderen Retinoiden; der therapeutische Einsatz ist sehr vielfältig. Seit 1962 ist Tretinoin im Kampf gegen Akne im Einsatz (Gollnick & Krautheim 2003). In Deutschland sind heute Isotretinoin und Tretinoin für die Behandlung schwere Formen der Akne zugelassen, z.B. zur oralen Therapie der Acne conglobata und zur topischen Anwendung bei leichter und mittelschwerer Acne vulgaris (Rote Liste 2005). Auch für die Therapie der Psoriasis und insbesondere der Ichthyosen werden Vitamin A-Derivate eingesetzt. Bei emphysematischen Lungenschäden zeigt die Anwendung von ATRA eine Rückbildung der pathologischen Veränderungen (Maden & Hind 2004). Zweifelsohne liegt die größte Hoffnung der Retinoide in dem Einsatz zur Tumorprävention bei Metaplasien und der Krebstherapie selbst (Petkovich 2001, Smith & Saba 2005). So haben Retinoide in den letzten Jahren in der Forschung große Erfolge im Bereich der Therapie maligner Erkrankungen gehabt, sei es der inhibitorische Effekt von ATRA auf das Wachstum des hepatozellulären Karzinoms (Piao *et al.* 2003), der antimetastatische Einfluss von ATRA auf Zellen des invasiven Prostatakarzinoms bei Ratten (Nwankwo 2002), die Verlangsamung des Wachstums bei squamösen Lungenkrebszellen (Bhattacharyya *et al.* 1997) oder der Einsatz bei T-Zelllymphomen und Kaposi's Sarkoma (Zouboulis 2001). Die Therapie der akuten promyeloischen Leukämie (APL) mit ATRA muss an dieser Stelle besonders erwähnt werden, da sie im Kontext zu dieser Arbeit außerordentlich relevant ist (Breitman *et al.* 1981, Chomienne *et al.* 1996, Fenaux *et al.* 2001).

### 1.4.2 Signaltransduktion

Retinoide entfalten ihre biologische Aktivität über zwei spezifische Rezeptorklassen, die Retinsäurerezeptoren (RAR) und die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR). Sie bestehen jeweils aus drei Unterformen RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und RXR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , die von separaten Genen kodiert werden und zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehören, zu denen auch Steroidhormonrezeptoren, Thyroidhormonrezeptoren und der Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor zählen (Petkovich *et al.* 1987). Die RARs vermitteln Signale der all-*trans*-Retinsäure und 9-*cis*-Retinsäure, während für die RXRs nur die 9-*cis*-Retinsäure Ligand ist. Für eine Rezeptoraktivierung und anschließende Signaltransduktion müssen RARs und RXRs heterodimerisieren. Das RAR/RXR-Heterodimer bindet im Nukleus an die responsiven Elemente (*Responsive Element*, RE) RARE (*Retinoic Acid Response Element*) und RXRE (*Retinoic-X Responsive Element*) (Yu *et al.* 1991, Mangelsdorf *et al.* 1990, 1992). Dabei handelt es sich um DNA-Segmente in den Promoter-/Enhancerregionen bestimmter, direkt Retinoid-responsiver Gene. Durch diese Bindung werden weitere Transkriptionsmodulatoren rekrutiert und auf diese Weise bestimmte Genabschnitte aktiviert (De Luca 1991, Dawson 2004). Dabei kann das RAR/RXR-Heterodimer über zwei Mechanismen die Genantwort beeinflussen. Eine positive Beeinflussung der Genexpression erfolgt über die Bindung des Heterodimers an die RAREs, während die Expression anderer Gene durch die Antagonisierung des Transkriptions-Faktor-Komplexes AP-1 oder NF- $\kappa$ B verhindert werden kann (Saatcioglu *et al.* 1994). Diese Mechanismen des An- und Abschaltens von Genen spielen unter anderem auch bei der Tumorentstehung und Tumorthherapie eine wichtige Rolle (Nagpal & Chandraratna 1998).

Über diese Signalwege vermitteln Retinoide entscheidende Prozesse der Embryonalentwicklung insbesondere während der Organogenese und ZNS-Entwicklung u.a. durch eine Modulation von Prozessen der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Dabei scheint die Verteilung der Retinoidrezeptoren eine ebenso wichtige Rolle zu spielen wie die Retinoidsynthese und dessen Katabolismus (Petkovich 2001).

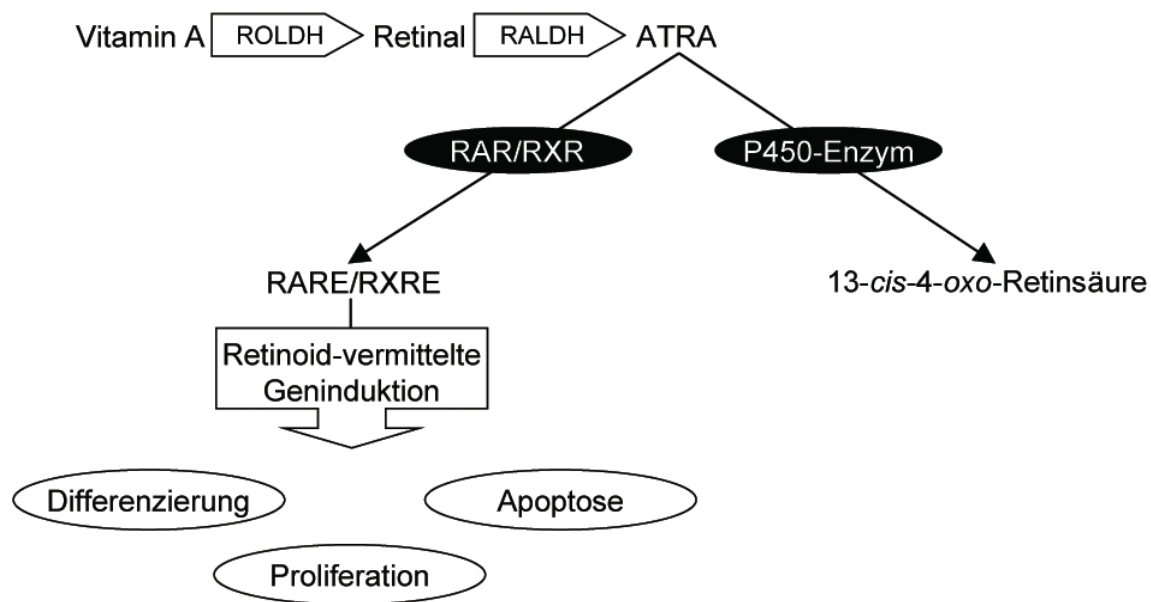


Abbildung 2: Metabolismus des Vitamin A. Der aktive Metabolit ATRA wird entweder über ein P450-Enzym zu 13-*cis*-4-oxo-Retinsäure abgebaut oder vermittelt seine Wirkung über spezifische Retinoidrezeptoren (RAR, RXR) und responsive Elemente (RARE, RXRE) im Nukleus.

#### 1.4.3 ATRA und die Hämatopoese

ATRA spielt auch bei der Regulation und Differenzierung verschiedener Zelltypen der Hämatopoese eine wichtige Rolle. Dies gilt insbesondere für Granulozyten und Makrophagen, weniger für die Erythropoese (Lawson & Berliner 1999, Collins 2002). Besonders anschaulich ist der Effekt von ATRA auf die Hämatopoese bei dem Einsatz als Therapeutikum zur Behandlung der APL, bei der es aufgrund einer Translokation t(15;17) zu einem Gendefekt des RAR $\alpha$ -Rezeptors kommt mit der Folge einer meist letalen Blastenakkumulation im peripheren Blut, also unreifen (undifferenzierten) und nicht funktionsfähigen Promyelozyten. ATRA bewirkt eine Differenzierung genau dieser leukämischen Blasten zu reifen neutrophilen Granulozyten (Chomienne *et al.* 1996). Untersuchungen zu Effekten von ATRA auf die Granulopoese unter Verwendung von hämatopoetischen Stammzellen (CD34<sup>+</sup>), myeloischen Vorläuferzellen oder stärker differenzierten Granulozytenvorläufern wiesen dabei durchaus in entgegengesetzte Richtungen, was sicherlich an den unterschiedlichen Reifestadien der einzelnen Vorläuferzellen lag (Purton *et al.* 1999, 2000, Douer *et al.* 2000, Sammons *et al.* 2000). Aber auch die Genese von Monozyten und eosinophilen und basophilen Granulozyten wird durch ATRA beeinflusst. So inhibiert ATRA die Differenzierung unreifer Vorläuferzellen eosinophiler und basophiler Granulozyten (Upham *et al.* 2002). Gleichzeitig kann ATRA bei der Behandlung der APL als Nebenwirkung eine reaktive Basophilie induzieren (Iwakiri *et al.* 1994, Shimamoto *et al.* 1994),

Das Diagramm zeigt die Differenzierung von myeloischen Vorläufern zu verschiedenen Granulozyten und Makrophagen. Die Zellen sind farblich markiert: grau für Vorläufer, grün für Myelozyten, blau für Basophiler Granulozyt, rot für Eosinophiler Granulozyt, lila für Monozyt/Makrophage und gelb für Mastzelle. Pfeile zeigen die Differenzierungswege an, wobei ATRA (Acute Promyelocytic Leukemia Treatment) in verschiedenen Stadien wirkt. Die Wirkung von ATRA ist durch Plus- und Minuszeichen (+/-) gekennzeichnet.

```

graph LR
    Stammzelle[Stammzelle CD34+] -- "ATRA +/-" --> MyeloischerVorläufer[Myeloischer Vorläufer]
    MyeloischerVorläufer --> CFU-GM[CFU-GM]
    MyeloischerVorläufer --> CFU-ME[CFU-ME]
    MyeloischerVorläufer --> CD13[CD13+ CD34+ c-kit+]
    CFU-GM -- "ATRA +/-" --> Myeloblast[Myeloblast]
    CFU-GM -- "ATRA -" --> Promyelozyt1[Promyelozyt]
    Promyelozyt1 -- "ATRA +" --> Myelozyt1[Myelozyt]
    Myelozyt1 --> NeutrophilerGranulozyt[Neutrophiler Granulozyt]
    CFU-GM --> Unbekannt1[?]
    Unbekannt1 --> BasophilerGranulozyt[Basophiler Granulozyt]
    CFU-GM --> Unbekannt2[?]
    Unbekannt2 --> EosinophilerGranulozyt[Eosinophiler Granulozyt]
    CD13 -- "ATRA -" --> Promyelozyt2[Promyelozyt]
    CD13 -- "ATRA -" --> Unbekannt3[?]
    Promyelozyt2 -- "ATRA +" --> Myelozyt2[Myelozyt]
    Myelozyt2 --> Monozyt[Monozyt]
    Monozyt -- "ATRA -" --> Makrophage[Makrophage]
    Unbekannt3 --> Mastzelle[Mastzelle]
  
```

24



#### 1.4.4 ATRA und die Mastzelle

Die Effekte von ATRA auf die Mastzelle stehen in dieser Arbeit im Mittelpunkt der Untersuchungen. Bis heute gibt es nur eine handvoll Publikationen bezüglich dieses Themas. Alle Publikationen zeigten – unabhängig vom bislang eingesetzten Mastzelltyp – einen deutlichen Einfluss von ATRA auf die Proliferation und Differenzierung.

Betrachtet man zunächst den Einfluss auf die Proliferation, so zeigt ATRA einen negativen Effekt auf die Entwicklung der Zellzahl in Kultur. Bei aus Nabelschnurblut gewonnenen Mastzellen (rhSCF-abhängige Mastzellgenerierung aus CD34<sup>+</sup>-Zellen) zeigte die Kombination von ATRA und rhSCF einen negativen Effekt auf die Entwicklung der Zellzahl in Abhängigkeit von der ATRA-Dosis (Kinoshita *et al.* 2000, Hjertson *et al.* 2003, Ishida *et al.* 2003, Shiohara & Koike 2005). Auch bei HMC-1 Zellen konnte dieser negative Effekt auf die Zellzahl nachgewiesen werden (Nilsson *et al.* 1994a, Alexandrakis *et al.* 2003, Hjertson *et al.* 2003). Desweiteren wurde der Zelldurchmesser durch eine Behandlung mit ATRA signifikant verkleinert und damit die Zellmasse zusätzlich vermindert (Kinoshita *et al.* 2000).

Die oben zitierten Studien untersuchten zusätzlich zur Proliferation auch den Einfluss von Retinoiden auf gewisse Aspekte der Mastzellreifung. Neben diesem beschriebenen negativen Effekt auf die Proliferation zeigten die Untersuchungen auch einen negativen Einfluss von ATRA auf die Mastzellreifung. Dabei konnte eine Reduktion des Histamingehalts (Kinoshita *et al.* 2000) und der intrazellulären Tryptasekonzentration (Hjertson *et al.* 2003, Ishida *et al.* 2003) in Mastzellen aus Nabelschnurblut durch eine ATRA-Behandlung nachgewiesen werden (Shiohara & Koike 2005). Untersuchungen an den unreifen HMC-1 Zellen zeigten eine starke Herunterregulation von c-kit (Nilsson *et al.* 1994a, Hjertson *et al.* 2003) und ebenfalls eine Reduktion der intrazellulären Tryptasekonzentration (Nilsson *et al.* 1994a, Alexandrakis *et al.* 2003), während andere Marker kaum oder nur schwach beeinflusst wurden (Nilsson *et al.* 1994a). Bei humanen Mastzellen wird der Einfluss von Retinoiden auf die Differenzierung offenbar hauptsächlich über den RAR $\alpha$  gesteuert (Kinoshita *et al.* 2000, Hjertson *et al.* 2003).

Die Arbeitsgruppe hat sich in der Vergangenheit bereits mit dem Einfluss von ATRA auf Zellsysteme beschäftigt, sich dabei aber auf bestimmte Moleküle wie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-3 und CD43 konzentriert, die eher mit der Rolle der Mastzelle bei der Immunabwehr als mit ihrer Entwicklung (Differenzierung) zu tun haben. Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Mastzellen mit ATRA zu einer Hochregulation von ICAM-1, ICAM-3 und CD43 führt. In diesem Zusammenhang wurden neben Mastzellen auch andere Zelltypen des myeloischen Systems untersucht. Diese zeigten teils ähnliche, teils aber entgegengesetzte Effekte (Babina *et al.* 1997a, 1997b, 2001).

Die bisherigen Untersuchungen geben deutliche Hinweise darauf, dass ATRA als zentrales Molekül der gesamten Myelopoese auch speziell in die Differenzierung der Mastzelle eingreift. Die bisherigen Erkenntnisse sind jedoch lückenhaft und lediglich Beschreibungen zu individuell ausgewählten Mastzellsystemen. Eine systematische Untersuchung zum Einfluss von ATRA auf die Expression von Differenzierungsmarkern bei humanen Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade fehlt bislang gänzlich und ist deshalb Gegenstand dieser Dissertation.

## 2 FRAGESTELLUNG

All-*trans*-Retinsäure (ATRA) ist ein aktiver Metabolit von Vitamin A und wird als Hormon klassifiziert. Das Retinoid entfaltet auf praktisch alle Zellen mit mitotischer Aktivität einen antiproliferativen Effekt. Darüber hinaus vermittelt ATRA eine i.d.R. differenzierende Wirkung auf eine Reihe von Zellarten. Dies gilt für Zellen des hämatopoetischen Systems und im besonderen für Zellen der myeloischen Reihe.

Betrachtet man die Literatur, so ist der Einfluss von ATRA auf Mastzellen kaum untersucht worden. Das betrifft vor allem Reifungsprozess-assoziierte Vorgänge während der Mastzellentwicklung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb getestet werden, ob ATRA in differenzierender oder dedifferenzierender Weise auf humane Mastzellen Einfluss nimmt und ob diese Effekte abhängig vom Reifegrad der Mastzellen sind.

Um die Abhängigkeit des Einflusses vom Reifegrad untersuchen zu können, sollte zunächst versucht werden, mit Hilfe von ausgewählten und in der Literatur als differenzierungswirksam beschriebenen Zytokinen/Wachstumsfaktoren, aus unreifen HMC-1 5C6 Zellen ein reiferes System zu generieren. Damit hätten mit der vollständig differenzierten kutanen Mastzelle (KMZ) für die Untersuchungen mit ATRA drei Mastzelltypen unterschiedlicher Reifegrade zur Verfügung gestanden.

Der Reifegrad der Mastzellen sollte dabei anhand typischer Mastzellmarker bestimmt werden, wobei der Grad ihrer Expression eine Beurteilung des Reifegrades erlaubt. Klassische Marker der Mastzelle sind der SCF-Rezeptor c-kit, der hochaffine IgE-Rezeptor FcεRI bestehend aus seinen drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), die beiden Serinendoproteasen Trypsase und Chymase sowie das Histamin und das diesen Mediator produzierende Enzym, die Histidindecaboxylase.

Die Messung ihrer Expression auf Proteinebene sollte mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt werden, während eine mögliche Veränderung auf transkriptioneller Ebene (mRNA) mit der RT-PCR zu quantifizieren war.

Für den ersten Teil der Arbeit wurden die beiden Interleukine IL-4 und IL-6 sowie der Nervenwachstumsfaktor NGF- $\beta$  ausgewählt. Zunächst sollten HMC-1 5C6 Zellen in einer Langzeitstudie (Kinetikstudie) 24 Tage mit diesen drei Substanzen inkubiert werden, um einen Überblick über die Zeitabhängigkeit der Effekte zu bekommen. In einem zweiten Schritt sollten dann die Haupteffekte durch Messwiederholungen akkurat quantifiziert und statistisch auszuwerten werden. Dabei wurde angestrebt, das ideale Zytokin – oder eine Kombination derer – zu identifizieren, das ein reiferes Zellsystem zwischen HMC-1 5C6 und KMZ schafft. Zur

Beschreibung des Reifegrades sollten die Mastzellmarker c-kit, FcεRIα und Trypase mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen werden. Aufgrund der großen Anzahl der zu messenden Proben musste eine Beschränkung auf diese drei Marker erfolgen.

Die drei Mastzellsysteme, die unterschiedliche Reifegrade repräsentieren, sollten im folgenden Teil der Dissertation mit ATRA behandelt werden. Diese Untersuchungen standen im Mittelpunkt der Arbeit. Neben den HMC-1 5C6 Zellen und dem weiter gezüchteten und idealer Weise reiferen System repräsentierten KMZ den vollständig differenzierten Mastzelltyp. Bei den KMZ handelte es sich um aus Vorhautgewebe isolierte Zellen. Zur Bestimmung der Einflüsse von ATRA auf humane Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade sollte der komplette Satz der zuvor aufgeführten Mastzellmarker jeweils auf Protein- und mRNA-Ebene – soweit exprimiert und möglich – untersucht und einer statistischen Auswertung unterworfen werden.

Das Vitamin A und sein aktiver Metabolit ATRA kommen in jedem menschlichen Organismus vor und sind für diesen essentiell. ATRA wird außerdem bei einer Reihe von Krankheiten als Therapeutikum eingesetzt. Mit dieser systematischen Untersuchung wird angestrebt, neue Kenntnisse über die mögliche Wirkungsweise von ATRA im Organismus durch Eruierung ihres Einflusses zu gewinnen. Durch den Vergleich verschiedener Mastzellsysteme werden zudem weitere Einblicke in die Mastzellentwicklung erwartet.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Technische Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Abzug	Köttermann
Autoklav (Typ 17)	Melag
Brutschrank	Heraeus
Casy 1 Zellzähler	Schärfe System
Coulter Elite Workstation Software XI2	Beckmann Coulter Electronics
Durchflusszytometer Epics XL	Beckmann Coulter Electronics
Gelelektrophoresekammer SUB-Cell GT mit Zubehör	Bio-Rad
Heizblock (Thermomixer 5436)	Eppendorf
Magnet Mini Macs	Miltenyi Biotec
Magnetrührer (IKAMAG Reo)	IKAMAG
Metallfilter (300, 150, 70, 40 µm)	Sigma
Microplate Reader, Software: Revelation MRX Vers. 3.22	Life Science Tech. Dynatech Lab.
Mikroskop (45 1485)	Zeiss
Mikroskop (92 499)	Zeiss
Mikroskop (ID 03)	Zeiss
Mikrowelle Mikromat	AEG
Neubauer Zählkammer	Neolab
Pipetten (verstellbar)	Eppendorf
Pipettierhilfen (Pipetus)	Hirschmann
Power Supply (Modell 1000/500)	Bio-Rad
Power Supply (ST 504)	Gibco
Schüttler (IKA-Vibrax-VXR)	Janke und Kunkel
Sterilbank ( <i>flow-bench</i> )	Karl Bleyemehl Reinraum-technik
Thermocycler Primus oder Primus 96 plus	MWG-Biotech
UV-Transilluminator	LKB
Vortex (Heidolph Reax 2000)	Heidolph Reax
Waage (Sartorius Universal)	Sartorius
Wasserbad (MS Lauda)	Lauda
Wasserbad (Thermo-Cycler 60)	Bio-Med
Wasserstrahlpumpe	Bio-Med

Zellzentrifuge (Minifuge RF)	Heraeus
Zentrifuge (5402)	Eppendorf

(Fortsetzung Technische Geräte)

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Bezugsquelle
6 -/24 -/96 - well Platten	Greiner
6-, 24- und 96-well-Platten (steril, für Suspensionskultur und Gewebekultur)	Greiner
FACS-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt
Falcon-Röhrchen (steril, 50 ml, 15 ml)	Greiner
Kanülen (Standardkanüle Nr. 1 gelb)	B. Braun
Kryoröhrchen	Greiner
Kunststoffauslaufpipetten (steril, 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Kunststoffflaschen (steril, 600 ml, 250 ml, 50 ml)	Greiner
Einmalhandschuhe	Hartmann
MACS Prä-Separationsfilter (30 µm)	Miltenyi Biotec
MACS Separation Columns LCC	Miltenyi Biotec
Nylongasefilter (30 µm)	Miltenyi Biotec
Petrischalen (verschiedene Größen)	Greiner
Phase Lock Gel	Eppendorf
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml, z. T. safe lock)	Eppendorf
Röhrchen (steril), (15 ml / 50 ml)	Greiner
Skalpelle	Bard-Parker
Spritzen (steril, 50 ml, 10 ml)	B. Braun
Sterilfilter (mit und ohne Vorfilter, 0,2 µm)	Sarstedt
Zellkulturflasche <i>Tissue Culture</i>	Greiner

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
β-Monothioglycerol (3-Mercapto-1,2-propandiol)	Sigma
100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
6x Loading Dye (Gelladepuffer)	MBI Fermentas
Accutase	PAA Laboratories

Aceton	Merck
Agarose	Boehringer Mannheim
Aqua Ad Iniectionabilia	B. Braun
Basal Iscove Medium 1x	Seromed
Bromphenolblau	Merck
BSA (Bovine Serum Albumin)	Boehringer Mannheim
Diethylcarbonat-(DEPC-)Wasser	Baack GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dispase I	Boehringer Mannheim
Ehdiumbromid	Sigma
Ethanol absolut	Merck
Ethylendiamin-tetra-Essigsäure (EDTA)	Serva
FCS (Fetal Calf Serum)	Seromed
HS (Horse Serum)	Seromed
Humanes AB-Serum (dialysiert)	Biotest
Kollagenase Typ 4	Worthington Biochemical Corp.
L-Glutamin	Seromed
Monothioglycerol	Sigma
Natriumacetat	Novagen, Merck Biosciences
PBS ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> ) (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) 1x	PAA Laboratories
PCR-Primer	TIB Molbiol
Pellet Paint Co-Precipitant	Novagen, Merck Biosciences
Penicillin/Streptomycin	Seromed
Phenylisoamylalkohol	Gibco
Toluidinblau	Seromed
Tris-Acetat	Sigma
Trypanblau	Seromed

### 3.1.4 Zelllinien

Zelllinie/Zelltyp	Bezugsquelle
HMC-1 Zellen	Dr. Butterfield
KMZ aus Vorhaut	Berliner Praxen und Kliniken
LAD 2 Zellen	Dr. Metcalfe

HMC-1 und LAD 2 Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Butterfield aus Rochester, MN, USA bzw. Dr. Metcalfe aus Bethesda, MD, USA zur Verfügung gestellt.

### 3.1.5 Kits

Kit	Bezugsquelle
1 <sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit	Boehringer Mannheim
Alexa Fluor TM 488 Labeling Kit	Molecular Probes
Mycoplasma Detection Kit	Roche Diagnostics
PCR Master Mix Kit	Boehringer Mannheim
QIAshredder	Qiagen
RiboGreen RNA Quantitation Kit	Molecular Probes
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Total RNA Kit	Qiagen
Vybrant Apoptosis Assay Kit no. 4	Molecular Probes

### 3.1.6 Agentia

Agens	Bezugsquelle
ATRA	Sigma
IL-4	R&D Systems
IL-6	R&D Systems
NGF- $\beta$	R&D Systems
rhSCF	R&D Systems
Cycloheximid	Calbiochem-Novabiochen
Cytochalasin B	Calbiochem-Novabiochen
Proteaseinhibitorcocktail	Roche
PMSF (Phenyl-Methyl-Sulphonyl-Fluorid)	Sigma

(Fortsetzung Agentia)

### 3.1.7 Antikörper

Antikörper (Spezifität)	Bezugsquelle
Anti-CD117 (c-kit) (YB5.B8)	Dr. Ashman
Anti-CD117-FITC (c-kit) (95C6)	Dianova
Anti-CD11a (25.3.1)	Immunotech
Anti-CD13 (MY7)	Immunotech
Anti-CD18 (3E8)	Immunotech
Anti-CD35 (J3D3)	Immunotech
Anti-CD43 (DF-T1)	Dakopatts



Anti-CD50 (ICAM-3) (CAL3.10)	R&D Systems
Anti-Chymase (3D5)	Biotrend
Anti-FcεRIα (29C6)	Dr. Hakimi
Anti-FcεRIα- FITC (29C6)	Dr. Hakimi, mit FITC Labeling Kit
Anti-Tryptase (AA1)	Serotec
Anti-Tryptase-FITC (AA1)	Serotec, mit FITC Labeling Kit
GAM-FITC	Jackson Immuno Research Lab
Isotypkontrolle Anti-IgG <sub>1</sub> (11711.11)	R&D Systems
Isotypkontrolle Anti-IgG <sub>1</sub> -FITC (11711.11)	R&D Systems
MACS Goat Anti-Mouse IgG Micro Beads	Miltenyi Biotec
Maus-γ-Globulin	Dianova

Die direkte Immunfluoreszenz kam bei KMZ, die indirekte Immunfluoreszenz bei HMC-1 5C6 und LAD 2 Zellen zum Einsatz. Anti-FcεRIα (29C6) und anti-CD117 (c-kit) (YB5.B8) wurden freundlicherweise von Dr. Hakimi aus Nutley, NJ, USA bzw. von Dr. Ashman aus Adelaide, Australien zu Verfügung gestellt. Dipl. Ing. S. Guhl übernahm freundlicherweise das FITC-Labeling der Antikörper anti-FcεRIα und anti-Tryptase mit dem Alexa Fluor Labeling Kit nach Herstelleranweisungen.

### 3.1.8 Puffer/Gel

Agarose-Gel 1,5%	- 0,75 g Agarose - 50 ml TAE (1x) (Agarose und TAE in der Mikrowelle erhitzen) - 5 µl Ethidiumbromidlösung
FACS-Puffer	- 0,05 % Na- Azid - 2 % FCS
MACS-Puffer	- PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> ) - 0,5 % BSA - 2mM EDTA
TAE-Puffer (50x)	- 40 mM Tris-Acetat - 2 mM EDTA (Die Lösung wurde mit konz. Essigsäure auf einen pH von 8,0 eingestellt)

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Steriltechnik

Um einer Kontamination mit Bakterien und Pilzen vorzubeugen, wurden Zellarbeiten stets in steriler Umgebung einer Arbeitsbank mit laminarem Luftabzug (*flow-bench*) durchgeführt, die vor Arbeitsbeginn immer mit alkoholischer Lösung gereinigt wurde. Einmalhandschuhe waren für die Arbeit obligatorisch. Alle benutzten Kunststoffmaterialien waren mit  $\gamma$ -Strahlung sterilisierte Einmalgeräte (Pipetten, Spritzen, Flaschen, Platten, Zentrifugenröhrchen). Pipettenspitzen und Eppendorfgeläße wurden für 30 min bei 134°C und 2 bar autoklaviert. Basal Iscove Medium und PBS wurden steril eingekauft. Zusätze wie fötales Kälberserum (*Fetal Calf Serum*, FCS), Pferdeserum (*Horse Serum*, HS), Streptomycin und Penicillin wurden durch Filter mit 0,2  $\mu$ m Porendurchmesser direkt in das Medium filtriert.

### 3.2.2 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 100%iger Luftfeuchtigkeit und CO<sub>2</sub>-Begasung von 5% kultiviert. Der Brutschrank war mit einem Alarmsystem ausgestattet, das aktiviert wurde, wenn die Richtwerte und damit die Standardisierung der Testreihen verletzt wurde.

#### 3.2.2.1 HMC-1 5C6 Zellen in Kultur

Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgte in Basal Iscove Medium unter Zusatz von entweder 10% hitzeinaktiviertem (30 min bei 56°C) FCS oder 20% hitzeinaktiviertem HS, außerdem 4 mM L-Glutamin, Penicillin (1000 IU/ml), Streptomycin (1 mg/ml) und 10  $\mu$ M Monothioglycerol. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt. Die Kultivierung von HMC-1 5C6 Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen bzw. -platten (Butterfield *et al.* 1988, Weber *et al.* 1996).

#### 3.2.2.2 LAD 2 Zellen in Kultur

Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgte in Basal Iscove Medium unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem FCS, 4 mM L-Glutamin, Penicillin (1000 IU/ml), Streptomycin (1 mg/ml) und 10  $\mu$ M Monothioglycerol. Zur Proliferation benötigten diese Zellen außerdem den rekombinanten Stammzellfaktor rhSCF (100 ng/ml). Alle vier Tage wurde das Medium gewechselt. Die Kultivierung der LAD 2 Zellen erfolgte entweder in Gewebekulturflaschen oder -platten (Kirshenbaum *et al.* 2003).

### 3.2.2.3 KMZ in Kultur

Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in Basal Iscove Medium unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem FCS, 4 mM L-Glutamin, Penicillin (1000 IU/ml), Streptomycin (1 mg/ml) und 10  $\mu$ M Monothioglycerol. Um *in vitro* eine siebentägige Inkubation mit Zytokinen/Wachstumsfaktoren oder ATRA bzw. Medium zu gewährleisten, benötigten die Zellen außerdem rhSCF (100 ng/ml). Die Kultivierung der KMZ erfolgte entweder in Gewebekulturflaschen oder -platten (Babina *et al.* 2004).

## 3.2.3 Zellzahl, Morphologie, Vitalität und Reinheit

### 3.2.3.1 Handzählung

Die Zellzählung und die Bestimmung der Vitalität wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau (0,5% [w/v] in PBS) durchgeführt und die Vitalität (in %) angegeben. Mit einer sauren Toluidinblaufärbung (0,1% [w/v] in 0,5 N HCl) konnte der Reinheitsgrad isolierter humaner Mastzellen bestimmt werden.

### 3.2.3.2 Automatisierte Zellzählung

Alternativ, zum Vergleich bzw. zur Korrektur der Handzellzählung, wurde die Zellzahl quantitativ mit dem CASY-Zellzähler als Dreifachmessung bestimmt. Zum Vereinzeln der Zellen mussten LAD 2 Zellen mit Accutase vorbehandelt werden, da sie im Gegensatz zu HMC-1 5C6 Zellen und KMZ stark adhärierende Eigenschaften besitzen und in Zellklumpen in Kultur zu finden sind. Der durchschnittliche Zelldurchmesser wurde von demselben Gerät bestimmt.

### 3.2.4 Behandlung der Zellen

Die Zellen wurden mit folgenden Substanzen behandelt:

Substanz	Konzentration
ATRA	1 $\mu$ M
IL-4	20 ng/ml
IL-6	50 ng/ml
NGF- $\beta$	10 ng/ml

Bei der Verwendung des Retinoids ist besonders auf seine Photosensibilität zu achten. ATRA isomerisiert infolge von Lichteinwirkung in die deutlich toxischere 13-*cis*-Retinsäure, teilweise auch in 9-*cis*-Retinsäure. Obwohl die Isomerisierung ihr Maximum erst nach über 90 Stunden erreicht, wurden sämtliche Untersuchungen, bei denen ATRA eingesetzt wurde, in abgedunkelter Umgebung durchgeführt (Goli & Brown 2004). Der ATRA-Bestand wurde bei -20°C, bei einer Konzentration der Stammlösung von 100 mM, im Antioxidant DMSO im Dunkeln aufbewahrt. DMSO (erst recht in der hier verwendeten enormen Verdünnung von 1:100.000) selbst hat keinerlei differenzierenden Effekt auf die parentale HMC-1 Zelllinie und wurde in einer Vergleichsstudie mit ATRA bereits in der Vergangenheit getestet (Nilsson *et al.* 1994a).

In den Versuchen zur Klärung der Mechanismen der kurzzeitigen Herunterregulation von c-kit wurden die Substanzen in den in Klammern angegebenen Konzentrationen eingesetzt: Cycloheximid (10  $\mu$ g/ml), Cytochalasin B (100  $\mu$ M) und Proteaseinhibitorcocktail (eine Tablette wurde in 10 ml Medium gelöst und 1/10 des Volumens machte den Endansatz aus) + PMSF (100  $\mu$ M).

Bei allen Versuchsreihen wurde zeitgleich unter Standardbedingungen eine Kontrollkultur mit Medium unterhalten, die bei der statistischen Auswertung als Negativkontrolle diente.

### 3.2.5 Erfassung der Apoptose

Die Messung apoptotischer und toter Zellen erfolgte nach der YO-PRO-1-Methode mit Hilfe des *Vybrant Apoptosis Assay Kits*. Das Prinzip beruht auf einer Veränderung der Permeabilität der Zellmembran während der Apoptose und dem Zelltod. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe YO-PRO-1 und Propidium-Iodid werden von intakten, lebenden Zellen weder passiv noch aktiv aufgenommen. Bei apoptotischen Zellen hingegen kann nur YO-PRO-1, nicht aber Propidium-Iodid, aufgrund der veränderten Permeabilität der Zellmembran in die Zelle eindringen. Bei toten Zellen passieren beide Farbstoffe die Zellmembran. Die YO-PRO-1- und Propidium-Iodid-

Fluoreszenzfärbung kann anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen und so der Zustand der Zellen dargestellt werden (Guhl *et al.* 2003).

### **3.3 Isolierung kutaner Mastzellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Mastzellen sind aus Vorhautgewebe nach Zirkumzision isoliert worden, die von kinderchirurgischen Praxen und urologischen Kliniken in Berlin in physiologischem Transportmedium geliefert wurden. Die Gewinnung der Mastzellen folgte mit kleinen Modifikationen einem etablierten Protokoll (Babina *et al.* 2004).

#### **3.3.1 Erster Tag der Vorhautpräparation**

Zuerst wurde die Vorhaut in zwei Waschgängen mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gereinigt, makroskopisch sichtbares Fettgewebe und Blutgefäße entfernt und in ca. 4 mm<sup>2</sup> große Quadrate zerschnitten, anschließend wurde sie über Nacht in Dispase (0,5 mg/g Vorhaut) eingelegt und unter Vibration bei 4°C inkubiert. Während dieser Zeit löst die Dispase die Bindung zwischen Epidermis und Dermis, und beide Hautschichten können dann mit einer Pinzette voneinander getrennt werden.

#### **3.3.2 Zweiter Tag der Vorhautpräparation**

Nach zwei Waschgängen folgte mit einer Pinzette die Trennung der Epidermis von der mastzellhaltigen Dermis, die mit einer Schere zu einer breiigen Konsistenz zerkleinert wurde, um dann nach einstündiger Inkubation bei 37°C im Bewegungsbad ( $f=190/\text{s}$ ) mit Kollagenase (10 mg/g Vorhaut) das Kollagengerüst aufzulösen. Die Epidermis wurde verworfen. Mit einem Metallfilter (150 µm Porengröße) wurde nun verdautes von unverdaulichem Gewebe getrennt, das Filtrat mit PBS zentrifugiert (1500 U/min, 10 min bei 4°C) und die Pellets resuspendiert, nach zwei weiteren Filtrationen (100 µm und 40 µm Porengröße) erneut zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Diese Pellets – nun einzelne Zellen – wurden erstmals in Medium (10 ml) aufgenommen, wie oben beschrieben gezählt, und anschließend bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^6/\text{ml}$  eine weitere Nacht im Brutschrank inkubiert.

#### **3.3.3 Dritter Tag der Vorhautpräparation**

Im Mittelpunkt des dritten Tages stand die gezielte Isolierung der c-kit-positiven Zellen an der MACS-Trennsäule. Vor einer erneuten Zellzählung wurden die Zellen zunächst einmal in PBS gewaschen, der Überstand entfernt und das Pellet resuspendiert, um dann den primären

Antikörper c-kit (YB5.B8, Endkonzentration 0,1 µg/ml) zu binden. Für je  $1 \times 10^7$ /ml Gesamtzellen wurde 100 µl Ansatzvolumen wie folgt berechnet:

20 µl inaktiviertes AB-Serum	20% des Ansatz-Volumens
2 µl YB5.B8	2% des Ansatz-Volumens
78 µl Zellen in MACS-Puffer	78% des Ansatz-Volumens

Zellpellet und obiger Antikörperansatz wurden in vorgekühlte 2ml-Kryo-Röhrchen überführt und 15 min auf einem Rotator (15-20 U/min, 4°C) inkubiert. Anschließend wurde dann das Inkubat in 15ml-Greiner-Röhrchen zurückgeführt, um es zweimal mit MACS-Puffer (2 mM EDTA und 0,5% BSA in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) zu waschen. Es ist zu beachten, dass sowohl die Puffertemperatur als auch die der Röhrchen stets bei 4°C gehalten wurde, um unspezifische Bindungen und Reaktionen zu vermeiden. Dann erfolgte die Kopplung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper, also an die magnetischen Partikel, anhand derer die c-kit-positiven Zellen mit Hilfe eines Magneten selektiert wurden. Für je  $1 \times 10^7$  Gesamtzellen wurde 100 µl Ansatzvolumen wie folgt berechnet:

20 µl inaktiviertes AB-Serum	20% des Ansatz-Volumens
20 µl magnetische Micro-Beads	20% des Ansatz-Volumens
60 µl Zellen in MACS-Puffer	60% des Ansatz-Volumens

Zellpellet und obiger Antikörperansatz wurden ebenfalls in vorgekühlte 2ml-Kryo-Röhrchen überführt und 15 min auf einem Rotator (15-20 U/min, 4°C) inkubiert. Auch jetzt wurde das Inkubat anschließend in 15ml-Greiner-Röhrchen zurückgeführt, dann aber nur einmal in MACS-Puffer gewaschen und die Zellen in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen.

Nach einer weiteren Filtrierung mit einem MACS-Prä-Separationsfilter und einem Waschschrift in MACS-Puffer wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden mit einer magnetischen Trennsäule, der MACS-Zell-Separationssäule, ebenfalls unter der *Flow-bench* durchgeführt. Die am Magneten positionierten Säulen wurden mit je 500 µl MACS-Puffer vorgespült, die 500 µl Zellsuspension auf die Säulen (bis zu  $1 \times 10^8$  Zellen pro Säule) pipettiert und dann dreimal mit der gleichen Menge MACS-Puffer nachgespült – einmal mit und zweimal ohne angebrachter Kanüle.

Die Säule, an der sich nun ausschließlich c-kit-positive Zellen magnetisch hielten, wurde von dem Magneten getrennt. Mit 500 µl MACS-Puffer konnten diese Zellen in 5ml-Röhrchen eluiert werden.

Zuletzt wurden die Zellen gezählt und deren Reinheit mit einer Toluidinblaufärbung bestimmt. Bei allen Präparationen waren ausschließlich über 90% der Zellen Toluidinblau gefärbt. Nun wurden die Mastzellen in Medium aufgenommen ( $1 \times 10^6$ /ml) und in verschiedenen Versuchen verwendet.

#### 3.3.4 Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle wurden die Mastzellen nach Aufreinigung und Toluidinblaufärbung anhand ihrer Oberflächenmoleküle in der Durchflusszytometrie in regelmäßigen Abständen charakterisiert. Dazu wurden FITC-markierte Antikörper gegen c-kit und FcεRIα (1 µg) eingesetzt (siehe Kapitel 3.4.3).

### 3.4 Durchflusszytometrie

Seit über dreißig Jahren ist es möglich mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*Flow cytometry*) eine Phänotypisierung von Zellen vorzunehmen und deren Morphologie und Funktion zu beschreiben.

Hinter der Durchflusszytometrie steht ein fluoreszenzoptischer Mechanismus, der Oberflächenmoleküle einzelner Zellen, die mit fluoreszierenden, monoklonalen Antikörpern markiert sind, nach Anregung durch Laserlicht (488 nm Argonlaser) identifizieren kann. Die durch das Laserlicht emittierten Fluoreszenzsignale können von dem Gerät verstärkt und gelesen werden, um anschließend von dem integrierten Rechner in eine verständliche Passform transponiert und dargestellt zu werden. Diese Methode bietet die Möglichkeit, einzelne Zellen quantitativ, schnell und exakt zu charakterisieren und deren Antigenstruktur zu erfassen (Scheffold & Kern 2000). So erlangte sie neben dem Einsatz in der Grundlagenforschung auch ein hohes Maß an klinischer Bedeutung, angefangen mit der Diagnostik hämatologisch-onkologischer Erkrankungen bis hin zur Ermittlung des Therapiebeginns bei der HIV-Erkrankung, der die Durchflusszytometrie auch den hohen Bekanntheitsgrad verdankt (Fritsch & Vanscheidt 1996).

### 3.4.1 Qualitätskontrolle

Die Gewährleistung der Qualität erfolgt erstens durch standardisierte Protokolle für die Probenvorbereitung, zweitens durch den Einsatz einer Isotypkontrolle bei jeder Messung, auf die sich die Proben beziehen, drittens durch das *Gating* der Zellen in der FSC-SSC-Bildanalyse, also einer Identifizierung der Zellen anhand ihrer Größe und Granularität auf Grundlage des Wissens über die zu bearbeitende Probe und viertens durch die Möglichkeit einer Zweitmessung, also einer Reproduzierbarkeit der Messung.

### 3.4.2 Coulter Epics XL

Die Messung der Proteinexpression auf der Zelloberfläche und intrazellulär wurde mit dem Epics XL Durchflusszytometer durchgeführt. Für die Markierung der zu untersuchenden Moleküle wurden monoklonale Maus-Primärantikörper verwendet, die entweder mit grün fluoreszierendem Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) oder rot fluoreszierendem Phycoerythrin (PE) konjugiert waren. Die Messung kann sowohl den Anteil fluoreszenzmarkierter Zellen (in %) und die Fluoreszenzintensität pro Zelle darstellen als auch die Morphologie und Granularität aller Zellen, also auch die der nicht markierten, ermitteln.

Epics XL saugt die antikörpermarkierte Zellsuspension durch eine feine Stahlkapillare ins Innere des Geräts, wo die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einzeln in einer Kapillare von einem Laserstrahl erfasst werden.

Dazu wird die Zellprobe aus der Kapillare in das Zentrum eines mit Flüssigkeit (*sheath fluid*) durchflossenen Raumes gespritzt. Durch die konische Form dieses Teilstücks wird der Durchmesser verkleinert und durch die konstante Strömung die Zellen im Zentrum einzeln aufgereiht. Auf diese Weise passieren die Zellen alle einzeln den Laserstrahl, und es kommt erstens zur Lichtstreuung aufgrund des Hindernisses ‚Zelle‘ aller Zellen und zweitens zur Photonenemission der FITC- oder PE-markierten Zellen.

Durch die Streusignale lassen sich Größe und Granularität der Zellen bestimmen. Die Größe (Volumen) der Zellen kann man anhand ihrer Vorwärtsstreuung (*Forward Scatter*, FS) entsprechend einer Lichtablenkung in spitzem Winkel zur Laserachse und die Granularität anhand ihrer Seitwärtsstreuung (*Side Scatter*, SS) entsprechend einer Lichtablenkung in stumpfem Winkel ermitteln. Das emittierte Fluoreszenzlicht (FL) kann natürlich auch in all diese Winkel ausstrahlen. Die Fluoreszenzsignale werden vom Gerät an dichromatischen Filtern registriert und die Information an Photodioden weitergeleitet. Die Lichtsignale finden sich in drei Fluoreszenzkanälen (FK) wieder, deren Filter unterschiedliche Wellenlängen detektieren können (Tabelle 2) und somit auch in der Lage sind, Zellen mit drei unterschiedlich markierten Antigenen gleichzeitig zu erfassen.



Tabelle 2: Fluoreszenzkanäle (FK) 1 bis 3 im Coulter Epics XL Durchflusszytometer. Die Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe FITC und PE werden von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen wahrgenommen.

	FITC	PE
FK 1	505-545 nm	520 nm
FK 2	555-595 nm	575 nm
FK 3	605-635 nm	

Die Abbildung der Messung in Form eines Histogramms zeigt die Fluoreszenzintensität der Zellen im Verhältnis zur Anzahl der Zellen als statistische Verteilung und wird logarithmisch aufgetragen. Dabei wird jede einzelne Zelle, die den Laser passiert, einem Kanal entsprechend ihrer Emissionsintensität zugeordnet und ist somit das Maß für die an einer Zelle gebundenen FITC- oder PE-Antikörper. Diese Einteilung erfolgt entweder in 512 oder 1024 Kanälen.

Zur Beurteilung einer fluoreszenzmarkierten Zellpopulation in der Durchflusszytometrie sind zwei Messgrößen wichtig: Zum einen der prozentuale Anteil an positiven Zellen – Zellen, die das entsprechende Antigen tragen – und zum anderen der Mittelwert der Kanalfluoreszenz (*Mean Channel Fluorescence*, MCF). Für den auch als *Mean* bezeichneten Wert gilt:

$$\text{Mean} = \frac{\sum (\text{Kanalnummer} \times \text{Zellzahl im Kanal})}{\text{Zellgesamtzahl in der Region}} \times 100$$

### 3.4.3 Probenvorbereitung, Messung und Datenanalyse

Für die Auswertung am Durchflusszytometer mussten die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC oder PE) markiert werden. Dafür stehen generell zwei Methoden zur Verfügung, die auch bei dieser Arbeit Anwendung fanden.

Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der primäre Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff kovalent verbunden. Die indirekte Immunfluoreszenz hingegen benötigt zwei Antikörper um im Durchflusszytometer messbar zu sein. Der primäre Antikörper bindet an das spezifische Epitop auf der Zelloberfläche. Zur Sichtbarmachung wird ein zweiter Antikörper eingesetzt, der den primären Antikörper bindet und ihn durch seinen Fluoreszenzfarbstoff sichtbar macht. Die indirekte Immunfluoreszenzmethode ist zwar zeitaufwendiger, birgt aber den Vorteil einer

leichten Signalverstärkung gegenüber der direkten Immunfluoreszenzmethode. Außerdem könne bei diese Methode auch solche Primärantikörper zum Einsatz gelangen, die in konjugierter Form nicht erhältlich sind.

Bei der zytometrischen Messung wurden jeweils  $5 \times 10^5$  behandelte und unbehandelte HMC-1 5C6 Zellen, LAD 2 Zellen und  $1 \times 10^5$  KMZ eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden stets auf Eis durchgeführt. In FACS-Röhrchen mussten die Zellen zunächst von Medium in zweimaligem Waschgang mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gereinigt und die Zellpellets mit autologem AB-Serum (10  $\mu\text{l}$ ) behandelt werden, um unspezifische Bindungen und Bindungsstellen an Fc-Rezeptoren zu blockieren. Der Primärantikörper (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sollte dann mindestens 30 min inkubieren. Kam die direkte Immunfluoreszenz zum Einsatz, so schloss sich zu diesem Zeitpunkt lediglich ein weiterer Waschgang mit PBS an, um dann die markierten Zellen im Durchflusszytometer zu messen. Außerdem musste im Falle KMZ zusammen mit dem AB-Serum noch 2  $\mu\text{l}$   $\gamma$ -Globulin zugesetzt werden, um verbliebene Bindungsstellen der anti-Maus-gekoppelten magnetischen Partikel abzusättigen. Bei der indirekten Immunfluoreszenz hingegen wurde nach einem weiteren Waschgang der sekundäre Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff hinzupipettiert. Eingesetzt wurden entweder 2  $\mu\text{l}$  eines FITC-Ziege-anti-Maus Immunglobulins (*Goat-Anti-Mouse*, GAM-FITC) oder GAM-PE. Nach weiteren 30 min Inkubation auf Eis folgten zwei Waschgänge. Zuletzt wurden die Zellen in 500  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen, am Durchflusszytometer analysiert und statistisch mit Coulter Elite Workstation Software XI2 ausgewertet. Die als Negativkontrolle eingesetzte Isotypkontrolle wurde erfahrungsgemäß auf 2% positive Zellen eingestellt. Dieser Wert stellt ungefähr den Anteil unspezifischer Bindungen und der Eigenfluoreszenz der Zellen dar, die gerade bei Zellen mit großem Durchmesser erheblich ist.

Bei der Auswertung gilt, dass der *Mean* direkt proportional zur durchschnittlichen Rezeptordichte des untersuchten Antigens ist und somit quantitativ dargestellt werden kann. Der *Mean* unterliegt tagesabhängigen Schwankungen und wird deshalb bei der Auswertung ins Verhältnis zur Isotypkontrolle gesetzt

Zur quantitativen Darstellung der Antigenexpression wurde der *Mean* der unbehandelten Zellen gleich 100% gesetzt und die Veränderung der Antigenexpression darauf bezogen. Für die Antigenexpression [in %] gilt demzufolge:

$$\text{Antigenexpression} = \frac{\text{Mean behandelter Zellen}}{\text{Mean unbehandelter Zellen}} \times 100$$

### 3.5 RT-PCR

#### 3.5.1 Grundlagen

Die reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) ist die sensitivste Methode, um mRNA zu detektieren und qualitativ wie quantitativ zu beschreiben. Zwei weitere Methoden (Northern Blot und RNase Protection Assay) stehen der Wissenschaft zur Verfügung, um die mRNA-Konzentration in Zellen zu bestimmen. Diese benötigen jedoch eine deutlich höhere absolute mRNA-Menge, was bei aufwendigen Einzelzellpräparationen wie der Aufreinigung von KMZ aus Vorhautgewebe nicht gewährleistet werden kann.

Neben der Messung der Proteinexpression, sei es superfiziell (auf der Zellmembran) oder intrazellulär (im Zytoplasma), ist die Bestimmung der mRNA für das Verständnis regulatorischer Prozesse in der Zelle von entscheidender Bedeutung. Die mRNA-Synthese und damit die Konzentration an mRNA im Zytoplasma ist ein wichtiger regulatorischer Schritt auf dem Weg vom Gen zum Protein. Sowohl die transkriptionelle Kontrolle als auch die *Processing*-Kontrolle bestimmen neben zusätzlichen Stabilitätskriterien die tatsächliche mRNA-Konzentration. Ist die mRNA einmal synthetisiert, so ist die Proteinsynthese meist nur ein angeschlossener Produktionsschritt und es besteht oft, wenngleich nicht immer, ein linearer Zusammenhang zwischen mRNA-Konzentration und Proteinsynthese.

In der vorliegenden Arbeit diente die RT-PCR dem quantitativen Nachweis der Transkripte der untersuchten Mastzellmarker (c-kit, Tryptase, Chymase, FcεRIα, FcεRIβ, FcεRIγ und HDC) und deren Beeinflussbarkeit durch ATRA.

Von der Zelle bis zur amplifizierten DNA sind viele Einzelschritte notwendig, die sich im Überblick aus Zelllyse, RNA-Extraktion und DNase-Verdau, Phenolisierung und Fällung, RNA-Reinheitsbestimmung und Quantifizierung, cDNA-Synthese und PCR zusammensetzen. Der RNeasy Total RNA Kit wurde zur Präparation der Gesamt-RNA aus Zellen genutzt.

Für die reverse Transkription der mRNA in cDNA wurde ein Einzelstrang-Synthesekit unter Verwendung arbiträrer Sechsernukleotide (*Random Primer*) nach Herstelleranweisungen benutzt. Die somit neu synthetisierte Einzelstrang cDNA wurde in der sich anschließenden PCR-Amplifizierung als Vorlage (*Template*) verwendet und war somit Arbeitsbasis für die anschließende Identifikation der Mastzellmarker auf mRNA-Ebene. Die eingesetzten *Primer* sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Masterkit und *Primer* stellten die nötigen Einzelkomponenten für die PCR-Amplifizierung dar. Die PCR-Amplifizierung ist ein Zyklus aus DNA-Denaturierung, *Primer*-Hybridisierung und Polymerisation, der sich bis zu fünfzig Mal wiederholen kann und durch Temperaturvariation in

einem sog. *Thermo-Cycler*, bestehend aus einem Erhitzungs- und Abkühlungsprozess, unterhalten wird.

An der jeweiligen Startsequenz des *Primers* beginnend, synthetisiert das thermostabile Enzym Tag-Polymerase an der cDNA einen komplementären Strang. Die entstandene Doppelstrang-DNA wird im anschließenden Zyklus wieder durch Denaturierung geteilt und die beiden resultierenden Einzelstränge dienen erneut als *Template* für den nächsten Zyklus.

Sämtliche Arbeiten mit RNA wurden mit Einmalhandschuhen durchgeführt, um eine Kontamination mit RNasen oder DNA zu vermeiden. Benutzte Glasware und Plastikreaktionsgefäße waren steril, Lösungen autoklaviert. Wasser wurde mit 0,1% Diethylcarbonat versetzt, kräftig geschüttelt, über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag vier Stunden bei 121°C autoklaviert (DEPC-Wasser).

### 3.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde der RNeasy Total RNA Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Wenn nicht anders beschrieben wurden alle folgenden Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 3.5.2.1 Zelllyse

Die behandelten Zellen wurden aus Gewebekulturflaschen oder -platten in Greiner-Röhrchen überführt, zentrifugiert (1400 U/min, 4°C, 10 min) und das Zellpellet im Anschluss zweimal mit eiskaltem, sterilem PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen, um dann auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6/\text{ml}$  Puffer eingestellt zu werden. 2 ml dieser Zellsuspension wurden in RNase-freie Eppendorfgefäße überführt, zentrifugiert (2000 U/min, 4°C, 10 min) und das entstandene Zellpellet mit einer Wasserstrahlpumpe trocken gesaugt, auf Eis gelagert und sofort mit 350 µl RTL Lysis Puffer versetzt. Nach einminütigem Vortexen wurden die lysierten Zellen zügig tiefgefroren (-80°C).

#### 3.5.2.2 RNA-Extraktion und DNase-Verdau

Der zweite Schritt konzentrierte sich auf die RNA-Extraktion aus lysierten HMC-1 5C6 Zellen, LAD 2 Zellen oder KMZ. Das aufgetaute Lysat musste zunächst zur Homogenisierung auf eine QIAshredder-Säule aufgetragen und 1 min zentrifugiert (10.000 U/min) werden. Anschließend wurde das Lysat mit 350 µl Ethanol (70%) gemischt, auf eine RNeasy-*Spin*-Säule pipettiert und für 15 s zentrifugiert (10.000 U/min). Die RNA-Fraktion wurde somit an die *Spin*-Säule

gebunden. Um kontaminierende Biomoleküle zu entfernen, wurde die *Spin*-Säule mit 700 µl RW1 Puffer gespült, wie im vorherigen Schritt zentrifugiert, anschließend mit DNase (10 µl DNase (entsprechen 30 U) und 70 µl RDD Puffer) behandelt und 20 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und Zentrifugieren der nun gänzlich DNA-freien Gesamt-RNA mit je 500 µl RPE Puffer (10.000 U/min, 15 s und 2 min) konnte sie in 50 µl DEPC-Wasser gelöst werden.

#### 3.5.2.3 *Phenolisierung und Fällung*

Die extrahierte Gesamt-RNA musste einem Phenolisierungs- und Fällungsprozess unterzogen werden, um von der DNase befreit und aufkonzentriert zu werden. Die in Wasser gelöste RNA wurde dazu mit 100 µl Phenylisoamylalkohol (Luftabzug!) in Gel enthaltende Eppendorfgefäße (Phase Lock Gel) zur Trennung von organischer und wässriger Phase pipettiert, zentrifugiert (10.000 U/min, 5 min) und die entstandene wässrige obere Phase in sterile Eppendorfgefäße überführt. Die gewonnene RNA-Lösung wurde mit Natriumacetat (3 M, 1:10) und 2 µl des Farbstoffs *Pellet Paint* (im Dunkeln!) versetzt und ein Volumen Ethanol absolut ergänzt. Nach zweiminütiger Inkubation bildete sich nach anschließendem Zentrifugieren (10.000 U/min, 5 min) ein dem Farbstoff entsprechendes rot angefärbtes RNA-Pellet, das mit der Wasserstrahlpumpe trocken gesaugt wurde. Zum Abschluss musste dieses zweimal mit Ethanol (200 µl, 70% und 100 µl, absolut) gewaschen, zentrifugiert (10.000 U/min, 5 min) und abgesaugt werden. Am Ende wurde das saubere Pellet in 20 µl DEPC-Wasser gelöst.

#### 3.5.2.4 *RNA-Reinheitsbestimmung und Quantifizierung*

Die Reinheit der RNA wurde mittels Elektrophorese bestimmt. Hierbei wurde RNA auf einem Agarose-Gel (1,5%), das sich in einer Elektrophoresekammer in Gelladepuffer befindet, in die charakteristischen 18S- und 28S-Banden ribosomaler RNA aufgetrennt (70 Volt, 30 min). Bandenunschärfe oder Schlieren im niedermolekularen Bereich sprächen für degradierte RNA. Eine DNA-Kontamination wäre an zusätzlichen Banden im höhermolekularen Bereich erkennbar gewesen. Quantifiziert wurde die RNA mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Ribogreen in 96-Well-Platten.

#### 3.5.3 *cDNA-Synthese*

Für die cDNA-Synthese wurde der Einzelstrang-Synthesekit 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Die RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) synthetisiert DNA-Kopien eines RNA-Moleküls. Es entsteht eine sog. komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA). Für die Synthese von cDNA-Molekülen wurden *Random Primer* verwendet. Sie

hybridisieren mit Nukleotiden auf der mRNA und fungieren so als Startpunkt für die reverse Transkriptase.

Standardmäßig wurde für die reverse Transkription pro Ansatz 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt und zu einem Endvolumen von 8,2 µl mit RNase/DNase freiem Wasser verdünnt. Wie in Tabelle 3 aufgelistet betrug das Gesamtvolumen für den Reaktionsansatz für die reverse Transkription 20 µl.

RNA-H<sub>2</sub>O-Ansatz und Mastermix wurden durch Vortexen gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt hybridisieren die *Random Primer* mit der mRNA. Während der sich anschließenden einstündigen Inkubation im Wasserbad (42°C) synthetisiert die reverse Transkriptase die cDNA. Der letzte Schritt, zehnminütiges Kochen (95°C), denaturiert die reverse Transkriptase, um bei der Amplifizierung spezifischer cDNA-Fragmente durch die PCR nicht zu interferieren. Die Proben wurden sofort auf Eis gelegt, mit H<sub>2</sub>O verdünnt (1:3) und dann bei -80°C bis zur Amplifizierung konserviert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des kompletten Reaktionsansatzes für die reverse Transkription (pro Ansatz) mit dem Einzelstrang-Synthesekit 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR (AMV).

Reagenz	Volumen/Ansatz (in µl)
10x Puffer	2,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,0
Desoxynukleotide	2,0
Random Primer	2,0
RNase-Inhibitor	1,0
reverse Transkriptase	0,8
Volumen Mastermix	11,8
RNA-H <sub>2</sub> O-Ansatz	8,2
Gesamtvolumen	20,0

#### 3.5.4 PCR

Die spezifische Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Für die Amplifizierung wurden Puffer und Reagenzien des PCR Master-Kits eingesetzt, der viele der für die PCR benötigten Komponenten bereitstellt (wie reverse Transkriptase, Desoxyribonukleotide, MgCl<sub>2</sub> etc.) und 5 µl cDNA-Lösung verwendet,

wobei die bereits verdünnte cDNA (1:3) bei allen Amplifizierungen bis auf FcεRIβ auf 1:30 weiterverdünnt wurde. Für die einzelnen *Primer* (Tabelle 4) wurden in Vorversuchen für die Amplifizierung der spezifischen DNA-Fragmente ideale Bedingungen getestet. Die allgemeinen PCR-Bedingungen und im besonderen die *Annealing*-Temperaturen sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 zusammengefasst. Der Gesamtansatz betrug für alle PCR-Amplifizierungen 25 µl und ist übersichtlich in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 4: Nukleotid-Sequenzen der eingesetzten *Primer*-Paare

Oligonukleotid	Sequenz
β-Aktin	Forward: 5'-AAT CTC ATC TTG TTT TCT GCG-3'
	Reverse: 5'-CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT-3'
c-kit	Forward: 5'-CTA GGA ATG TGT AAG TGC CTC C-3'
	Reverse: 5'-CGT TGA CTA TCA GTT CAG CGA G-3'
Chymase	Forward: 5'-TCCGACCGTCCATAGGATACG-3'
	Reverse: 5'-CCCTTATTCCATCCACGGGTCTC-3'
FcεRIα	Forward: 5'-CTG TTC TTC GCT CCA GAT GGC GT-3'
	Reverse: 5'-TAC AGT AAT GTT GAG GGG CTC AG-3'
FcεRIβ	Forward: 5'-GAT CAG GAT GGT AAT TCC CGT T-3'
	Reverse: 5'-GGA CAC AGA AAG TAA TAG GAG AG-3'
FcεRIγ	Forward: 5'-CCA GCA GTG GTC TTG CTC TTA C-3'
	Reverse: 5'-GCA TGC AGG CAT ATG TGA TGC C-3'
HDC	Forward: 5'-AGC TGC CTG AGA GTG CTC CTG A-3'
	Reverse: 5'-GCA TTT TTG CCA ACC AGT CCA T-3'
Tryptase	Forward: 5'-GGA GCT GGA GGA GCC CGT GA-3'
	Reverse: 5'-ACC TGG GTA GGA AGC AGT GGT G-3'

Tabelle 5: Allgemeine PCR-Bedingungen: Einstellungen der einzelnen Sequenzen des Thermo-Cyclers.

Sequenz	Temperatur/sonstiges	Dauer
Initiale Denaturierung	94°C	5 min
Primerannealing		1 min
Tabelle 6		
Elongation	72°C	1 min
Denaturierung	94°C	45 s
Letzte Elongation	72°C	5 min
Zyklen-Anzahl		
Tabelle 6		

Tabelle 6: Spezielle Bedingungen für die PCR-Amplifikation: *Annealing*-Temperatur und Anzahl der Zyklen für HMC-1 5C6 / LAD 2 / KMZ. \*Chymase und FcεRIβ sind bei HMC-1 5C6 Zellen auf mRNA-Ebene nicht detektierbar.

Oligonukleotid	<i>Annealing</i> -Temperatur (in °C)	Anzahl der Zyklen
β-Aktin	58	23/25/25
c-kit	60	30/29/29
Chymase	60	40*/32/30
FcεRIα	50	35/30/30
FcεRIβ	50	40*/30/30
FcεRIγ	65	32/28/28
HDC	62	28/28/28
Tryptase	60	27/27/25



Tabelle 7: Gesamtansatz für die spezifische Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit der PCR. Verwendet wurde der PCR Master-Kit nach Herstellerangaben. Die Primer lagen je in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  vor.

Reagenz	Volumen/Ansatz (in $\mu\text{l}$ )
Master-Mix	12,5
5'Primer	2,5
3'Primer	2,5
H <sub>2</sub> O	2,5
Volumen Master-Ansatz	20,0
cDNA (i.d.R. 1:30)	5,0
Gesamtvolumen	25,0

### 3.5.5 Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte in Agarose-Elektrophorese. Die Agarosekonzentration betrug 1,5% und wurde in TAE-Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromidlösung (1:10.000) versetzt und 20 min in der Gelapparatur gehärtet. In der Elektrophoresekammer wurde das Gel mit TAE (50x) überschichtet, dann die DNA-Fragmente (10  $\mu\text{l}$ ) mit Gelladepuffer (2  $\mu\text{l}$ ) gemischt, in die Geltaschen hineinpipettiert und durch Anlegen elektrischer Spannung (6 Volt/cm) aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde außerdem ein DNA-Standard mit 100 Basenpaaren auf das Gel aufgetragen (100 bp Leiter). Nach der Elektrophorese (45-60 min) wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht und digital photographiert.

## 3.6 Statistik

Um die Ergebnisse auf statistische Signifikanz zu untersuchen und die Standardabweichungen (*Standard Deviation*, SD) zu berechnen, wurden die Microsoft-Excel Dateien, in die alle Ergebnisse dieser Arbeit eingetragen wurden, in das Statistikprogramm STATA 8.0 importiert. Die einzelnen Messungen sind als unabhängige Ereignisse zu betrachten. Die Teststatistik wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt. Es wurde definiert, dass ein p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant, ein p-Wert  $\leq 0,01$  als hoch signifikant und ein p-Wert  $\leq 0,001$  als sehr hoch signifikant bezeichnet werden kann.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der verwendeten Zellen

Diese Arbeit lässt sich in zwei Fragestellungen gliedern. Erstens: Welche der in der Literatur als mastzellregulierend beschriebenen Zytokine IL-4, IL-6 und NGF- $\beta$  haben Einfluss auf die Differenzierung einer Mastzelllinie, die ein frühes Reifestadium repräsentiert? Zweitens: Beeinflusst all-*trans*-Retinsäure (ATRA) die Differenzierung von Mastzellen? Letzterer schließt sich der Zusatz an, inwieweit diese Effekte ggf. unterschiedlich sind bezogen auf Mastzellsysteme unterschiedlicher Reifegrade.

Wie in vorangegangenen Abschnitten beschrieben, sind die drei humanen Mastzellsysteme unterschiedlicher Reife Grundlage der Dissertation. Vor den angestrebten Behandlungen wurden die drei Systeme zunächst charakterisiert, um eventuelle Abweichungen von den in der Literatur beschriebenen Zelleigenschaften, die schließlich den Differenzierungsgrad der einzelnen Zelltypen festlegen, zu erfassen und zu dokumentieren.

#### 4.1.1 Charakterisierung von HMC1-5C6 Zellen

In dieser Arbeit repräsentierten HMC-1 5C6 Zellen das am wenigsten reife der drei Mastzellsysteme. Es ist allerdings stärker differenziert als die parentale HMC-1 Zelllinie (Butterfield *et al.* 1988) und weist deutlichere Mastzellcharakteristika auf, die in der Literatur bereits beschrieben wurden (Weber *et al.* 1996).

HMC-1 5C6 Zellen exprimierten in den hiesigen Studien die  $\alpha$ -Untereinheit des Fc $\epsilon$ RI-Rezeptors praktisch nur intrazellulär, auf der Zelloberfläche war nur eine sehr schwache Detektion möglich. In starkem Umfang ließen sich der SCF-Rezeptor c-kit und die Tryptase nachweisen (Abbildung 4). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression einer Reihe weiterer Marker, die als pan-leukozytär gelten oder für andere Zelltypen spezifisch sind, untersucht. HMC-1 5C6 Zellen exprimierten CD43, CD50 (ICAM-3), CD11a, CD18 und CD35 in absteigender Reihenfolge ihrer Intensität. HMC-1 5C6 Zellen proliferierten stark mit einer Verdopplung der Zellzahl innerhalb von 30-36 Stunden (Ergebnisse nicht dargestellt).

#### 4.1.2 Charakterisierung von LAD 2 Zellen

Ein intermediäres Reifestadium stellen LAD 2 Zellen dar. Im Gegensatz zu HMC-1 5C6 Zellen verfügt diese Mastzelllinie über einen funktionellen IgE-Rezeptor Fc $\epsilon$ RI, und das SCF-Rezeptorgen c-kit ist nicht mutiert (Kirshenbaum *et al.* 2003).

LAD 2 Zellen exprimierten die  $\alpha$ -Untereinheit des Fc $\epsilon$ RI-Rezeptors ausgesprochen stark, außerdem in ähnlichem Maße wie HMC-1 5C6 Zellen c-kit und Tryptase (Abbildung 5). LAD 2 Zellen besaßen eine schwache Proliferationskapazität, die rhSCF abhängig war. Im Einklang mit der Literatur (Kirshenbaum *et al.* 2003) verdoppelte sich ihre Population nach etwa zwei Wochen (Ergebnisse nicht dargestellt).

#### 4.1.3 Charakterisierung von KMZ

Die aus Vorhautpräparationen stammenden KMZ exprimierten die  $\alpha$ -Untereinheit des Fc $\epsilon$ RI-Rezeptors in ähnlichem Umfang wie die LAD 2 Zellen; zusätzlich exprimierten die KMZ natürlich auch c-kit und die Tryptase (Abbildung 6).

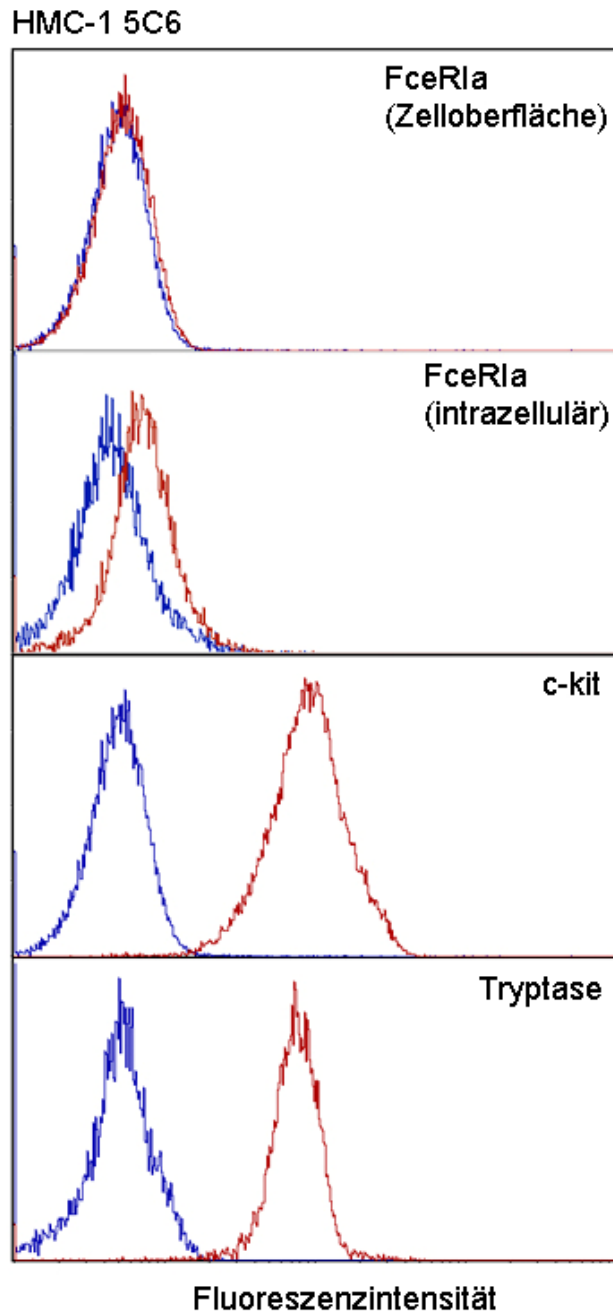


Abbildung 4: Flowzytometrie-Histogramm: Repräsentative Darstellung der Mastzellmarker FcεR1α, c-kit und Tryptase bei unbehandelten HMC-1 5C6 Zellen. Die Zellen wurden in reinem Medium im Brutschrank kultiviert. Blau: Isotypkontrolle; Rot: Proteine (wie beschriftet). Die α-Kette des IgE-Rezeptors FcεR1α wurde sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär nach Permeabilisierung mit Hilfe der Flowzytometrie gemessen. FcεR1α wird superfiziell praktisch nicht exprimiert.

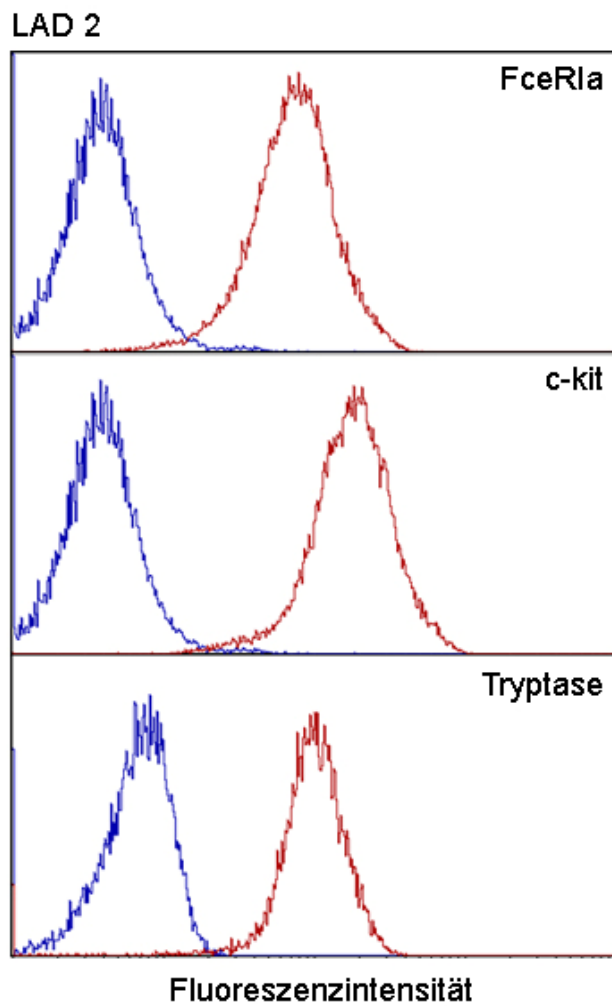


Abbildung 5: Flowzytometrie-Histogramm: Repräsentative Darstellung der Mastzellmarker FcεRIα, c-kit und Tryptase bei unbehandelten LAD 2 Zellen. Die Zellen wurden in reinem Medium im Brutschrank kultiviert. Blau: Isotypkontrolle; Rot: Proteine (wie beschriftet).

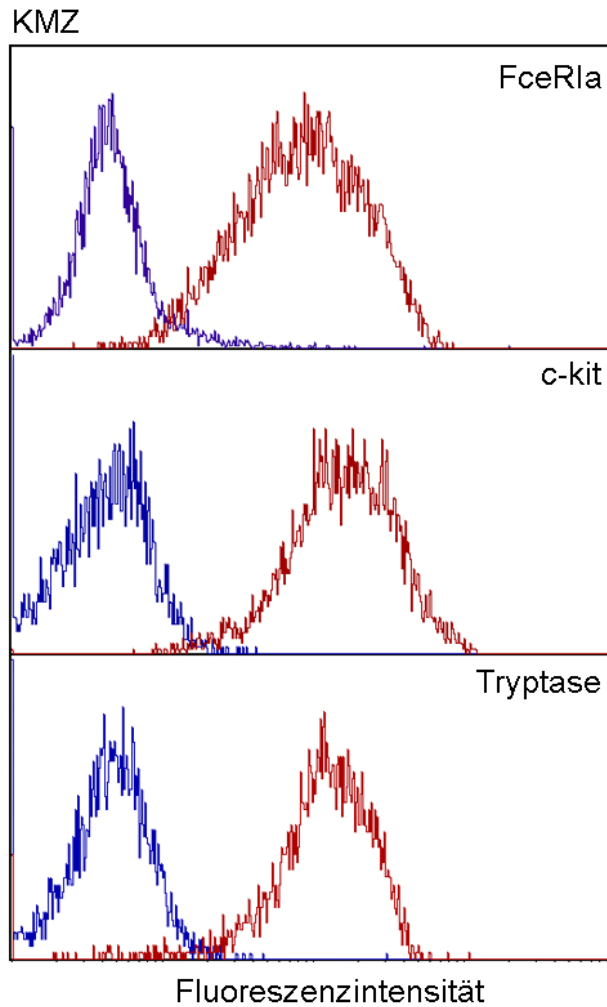


Abbildung 6: Flowzytometrie-Histogramm: Repräsentative Darstellung der Mastzellmarker FceRI $\alpha$ , c-kit und Tryptase bei unbehandelten kutanen Mastzellen direkt nach ihrer Isolierung aus Vorhautgewebe. Blau: Isotypkontrolle; Rot: Proteine (wie beschriftet).

## 4.2 Einflüsse von IL-4, IL-6 und NGF- $\beta$ auf HMC-1 5C6 Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit gab es weltweit ausschließlich eine einzige humane Mastzelllinie, nämlich HMC-1 (Butterfield *et al.* 1988, Nilsson *et al.* 1994a), aus der von unserer Arbeitsgruppe durch limitierte Verdünnung ein stärker differenzierter Subklon generiert wurde (Weber *et al.* 1996). Dieser HMC-1 5C6 genannte Subklon hat gegenüber seiner parentalen Vorläuferzelle den Vorteil, Mastzellcharakteristika in stärkerem Umfang aufzuweisen und eine einheitlichere Zellpopulation darzustellen, wenngleich auch diese Zellen ein sehr frühes Stadium der Mastzellgeneration repräsentieren.

Um die Frage zu beantworten, ob die Einflüsse von ATRA auf die Mastzelle abhängig von deren Reifegrad (und/oder Proliferationspotential) sind, sollte mit den ausgewählten und in der Literatur als differenzierungswirksam beschriebenen Zytokinen IL-4, IL-6 und NGF- $\beta$  (Nilsson *et al.* 1994b, 1995, Toru *et al.* 1996, Xia *et al.* 1997, Ryan *et al.* 1998, Bischoff *et al.* 1999, Kanbe *et al.* 2000, Welker *et al.* 2000, Kambe *et al.* 2001) ein intermediär differenziertes Mastzellsystem generiert werden, um anschließend die Einflüsse von ATRA auf drei Mastzellmodelle unterschiedlicher Reife (HMC-1 5C6, Zytokin-behandelte HMC-1 5C6 Zellen und KMZ) testen zu können.

Aufgrund vorausgegangener Überlegungen und Vorversuche wurden HMC-1 5C6 Zellen zunächst in einer Kinetikstudie über 24 Tage hinweg unter Zusatz der drei Zytokine jeweils einzeln (IL-4, IL-6 und NGF- $\beta$ ) und in Kombination (IL-4+IL-6, IL-4+NGF- $\beta$ , IL-6+NGF- $\beta$  und IL-4+IL-6+NGF- $\beta$ ) kultiviert und alle drei Tage die Mastzellmarker, der SCF-Rezeptor c-kit, die Tryptase und die  $\alpha$ -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors Fc $\epsilon$ RI mit Hilfe der Flowzytometrie gemessen. Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  und die Tryptase wurden intrazellulär nach Permeabilisierung der Zellmembran gemessen. Anhand einer Hoch- bzw. Herunterregulation dieser Proteine durch Zytokine können Rückschlüsse auf den Reifegrad (Differenzierungsgrad) der Mastzelle gezogen werden. Außerdem wurden mögliche Einflüsse der Zytokine auf die Zellzahl und den Zelldurchmesser in dreitägigen Intervallen untersucht. Mit der 24tägigen Kinetik sollte ermittelt werden, ob eine längere Zytokinbehandlung – zum Beispiel 24 Tage – andere Effekte aufweist als eine Kultivierung von beispielsweise drei Tagen.

### 4.2.1 Vorversuche: Einflüsse der Zytokine auf HMC-1 5C6 Zellen

Die Vorversuche umfassten Untersuchungen zu Einflüssen von IL-4, IL-6 und NGF- $\beta$  auf HMC-1 5C6 Zellen in Medien mit fötalem Kälberserum (*Fetal Calf Serum*, FCS) bzw. Pferdeserum (*Horse Serum*, HS). In zehn Testreihen konnte gezeigt werden, dass IL-4 bei HMC-1 5C6 Zellen sowohl eine Herunterregulation der Mastzellmarker verursacht als auch die Zellzahl vermindert.

IL-6 und NGF- $\beta$  wiesen dagegen nur schwache Effekte auf. Außerdem zeigte sich die Kultivierung in HS gegenüber in FCS von Vorteil, da die Effekte deutlicher waren (Ergebnisse nicht dargestellt).

#### 4.2.2 Kinetikstudie: Einflüsse der Zytokine auf HMC-1 5C6 nach 24 Tagen

HMC-1 5C6 Zellen wurden 24 Tage mit Zytokinen behandelt und alle drei Tage mit Hilfe der Flowzytometrie gemessen, die verbliebenen Zellen mit frischen Zytokinen restimuliert und weiterkultiviert.

Anhand dieser Kinetikstudie konnte gezeigt werden, dass die Effekte der Zytokine selbst nach 24tägiger Inkubation nicht stärker ausgeprägt waren als schon nach drei Tagen. Am eindruckvollsten wurde das Ergebnis anhand des Mastzellmarkers c-kit sichtbar. Mit drei Ausnahmen waren am dritten Tag der Inkubation, also am Messtag 3, die Effekte am ausgeprägtesten (Diagramm 1: IL-4, IL-6, NGF- $\beta$ , IL-6+NGF- $\beta$ ). So ergab sich unter IL-4, allein oder in Kombination mit anderen Zytokinen, ein Rückgang der c-kit Expression um mehr als 50% bereits nach dreitägiger Inkubation (Diagramm 1: IL-4, IL-4+IL-6, IL-4+NGF- $\beta$ , IL-4+IL-6+NGF- $\beta$ ). Im weiteren Verlauf der 24tägigen Kinetik war kein Trend in der c-kit Expression zu erkennen. Das gleiche Ergebnis zeigte sich, jedoch weniger ausgeprägt, auch bei der Tryptase und Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  (Ergebnisse nicht dargestellt).

Aus diesen Resultaten ließ sich ableiten, dass erstens eine dreitägige Inkubationszeit mit Zytokinen ausreicht um Effekte zu erzielen und zweitens IL-4 einen erheblichen Effekt im Sinne einer Herunterregulation der Mastzellmarker c-kit, Tryptase und Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  hat, der durch Kombinationen mit anderen Zytokinen nicht aufgehoben, höchstens abgeschwächt werden kann.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der bereits mehrfach in der Literatur beschrieben wurde, war die Verminderung der Zellzahl unter dem Einfluss von IL-4 im Vergleich zur Mediumkontrolle. So wiesen alle IL-4-haltigen Zytokinkombinationen einen stark antiproliferierenden Effekt auf die Zelllinie HMC-1 5C6 auf, was im nachfolgenden Abschnitt (siehe Kapitel 4.2.3) genauer beleuchtet wird.



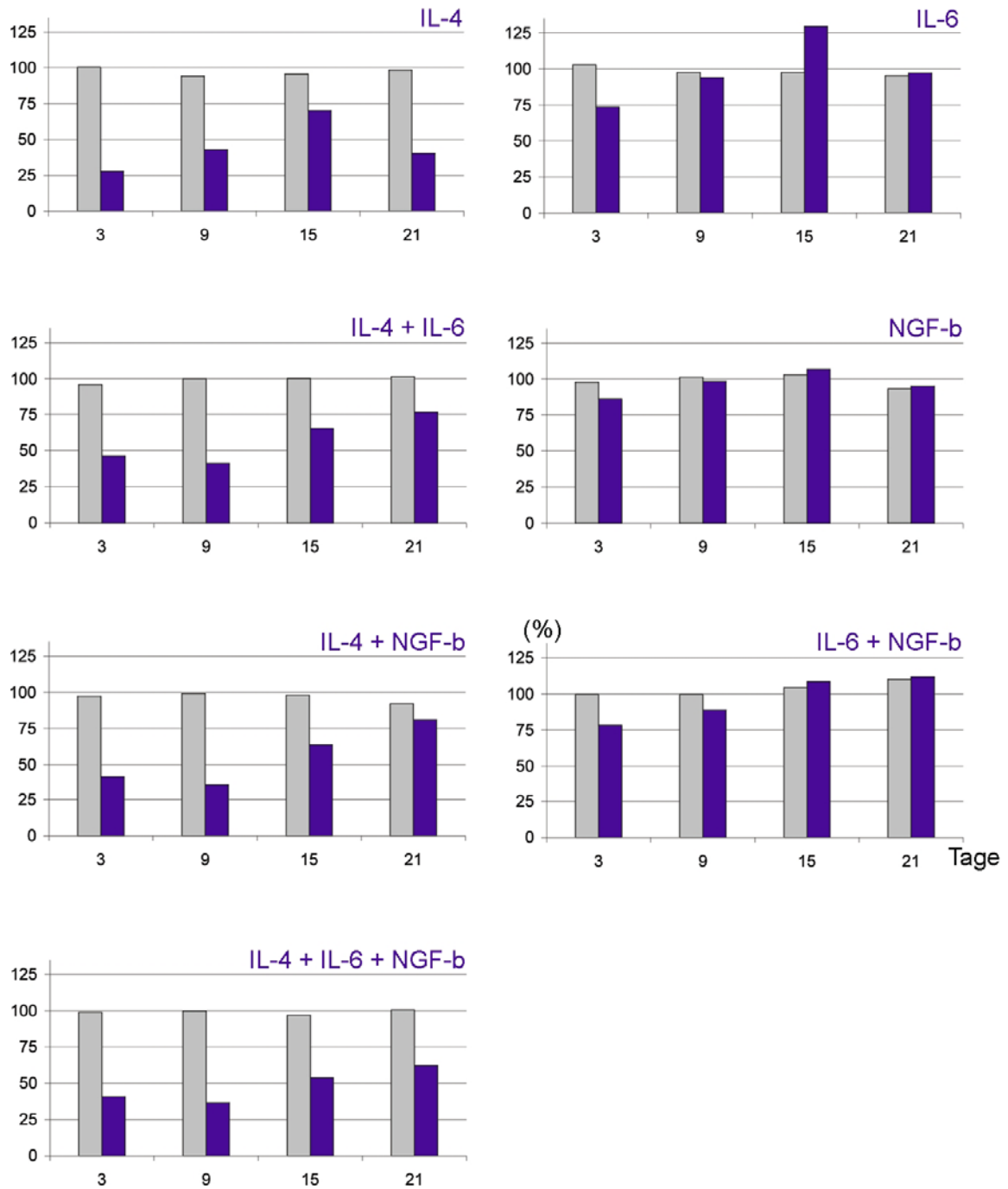


Diagramm 1: Darstellung der c-kit Expression (blau) auf HMC-1 5C6 Zellen im Vergleich zur Isotypkontrolle (grau) während der 24tägigen Inkubation mit IL-4, IL-6 und NGF-β. Die Daten der Behandlungen beziehen sich auf die Messwerte der Mediumkontrolle des jeweiligen Messtages (in %). Gezeigt wird jeder zweite Messtag (Messtage 3, 9, 15 und 21). Zur optischen Veranschaulichung sind auf der linken Blatthälfte alle IL-4-haltigen Behandlungen abgebildet.

#### 4.2.3 Quantifizierung der Einflüsse der Zytokine auf HMC-1 5C6 Zellen

Nach den Vorversuchen und der 24tägigen Kinetik schließt sich nun die Reproduktion und genauere Quantifizierung der Ergebnisse an. Dazu wurden HMC-1 5C6 Zellen mit allen sieben Zytokinkombinationen (IL-4, IL-6, NGF- $\beta$ , IL-4+IL-6, IL-4+NGF- $\beta$ , IL-6+NGF- $\beta$  und IL-4+IL-6+NGF- $\beta$ ) bzw. mit Kontrollmedium drei Tage lang behandelt und anschließend mit Hilfe der Flowzytometrie die Mastzellmarker c-kit, Tryptase und Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  gemessen, um die in den Vorversuchen angedeuteten Effekte zu bestätigen und statistisch auszuwerten.

Der stärkste Effekt ging wie erwartet von IL-4 aus und wies eine starke Abnahme der Proteinexpression von c-kit, Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  und Tryptase (absteigend nach der Stärke der Suppression) gegenüber der Mediumkontrolle ohne Zytokinzusatz (gesetzt 100%) auf (Diagramm 2: IL-4). Auch in Kombination mit den Zytokinen IL-6 und NGF- $\beta$  dominierte IL-4 mit seiner inhibitorischen Eigenschaft bezüglich der Expression der Mastzellmarker (Diagramm 2: IL-4+IL-6, IL-4+NGF- $\beta$ , IL-4+IL-6+NGF- $\beta$ ), während IL-6 allein oder in Kombination mit NGF- $\beta$  eine Hochregulation des SCF-Rezeptors c-kit verursachte. Die Kombination beider verursachte außerdem eine Hochregulation der Tryptase (Diagramm 2: IL-6, IL-6+NGF- $\beta$ ). Der alleinige Einsatz von NGF- $\beta$  zeigte keinen Effekt in Bezug auf die Expression der Mastzellmarker (Diagramm 2: NGF- $\beta$ ).

Zusammenfassend induzierte IL-4 eine Herunterregulation aller drei Mastzellmarker und hatte somit scheinbar dedifferenzierende Eigenschaften bezüglich dieser an sich schon unreifen Mastzelllinie HMC-1 5C6. Der stärkste Effekt konnte bei c-kit und der schwächste Effekt bei Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  mit Hilfe der Flowzytometrie gemessen werden. Genau wie bei der parentalen HMC-1 Zelle (Valent *et al.* 1991) wirkte IL-4 auch bei dessen Subklon hemmend auf die Proliferation, was sich schon bei der 24tägigen Kinetik angedeutet hatte (Diagramm 3). Die anderen Zytokine hingegen zeigten nur minimale (IL-6) oder keine (NGF- $\beta$ ) Effekte auf die Proliferation.

Der angestrebte differenzierende Effekt, um ein intermediär entwickeltes Mastzellstadium zwischen HMC-1 5C6 Zellen und KMZ zu generieren, blieb aus. Beachtlich war aber die deutlich dedifferenzierende Eigenschaft von IL-4. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde zunächst weiter in diesen Themenkomplex investiert und die Fragestellung bearbeitet, ob IL-4-vermittelte Effekte abhängig vom Differenzierungsgrad der Mastzelle sind.

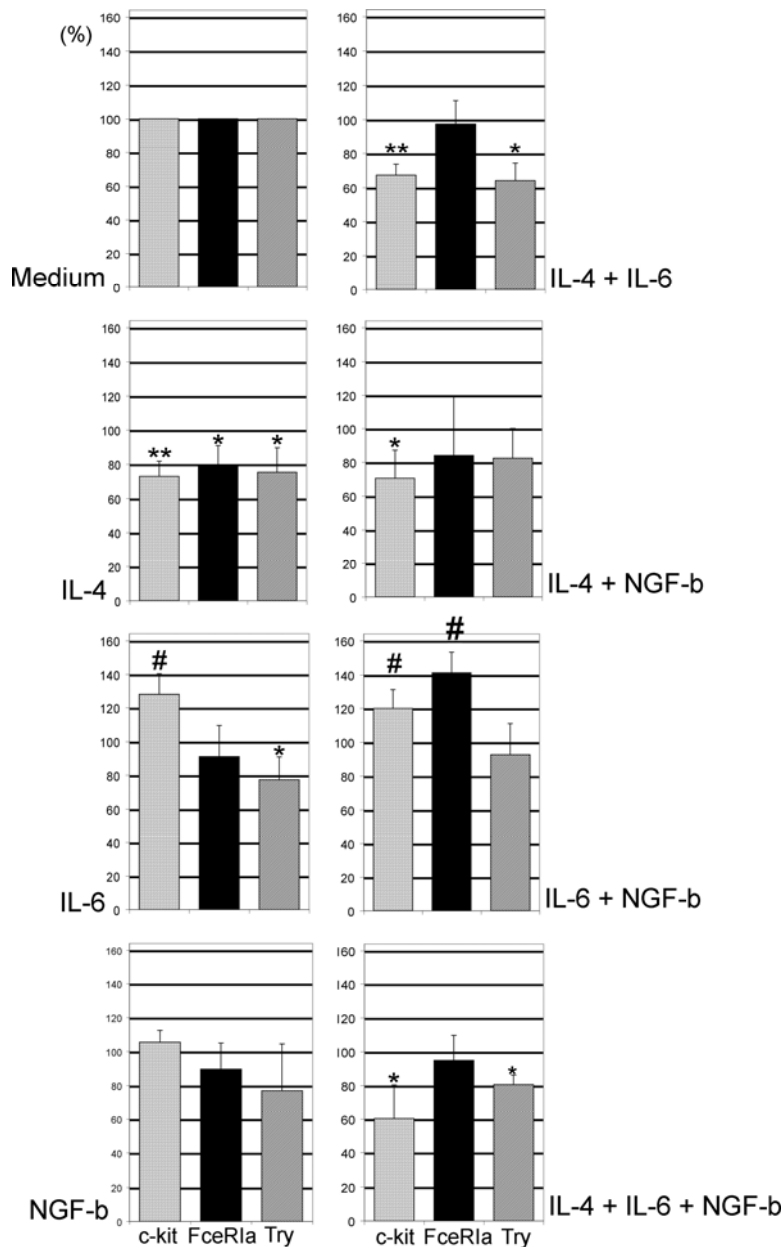


Diagramm 2: Expression der Mastzellmarker FcεRIα, c-kit und Tryptase (Try) bei HMC-1 5C6 Zellen nach dreitägiger Inkubation mit IL-4, IL-6 und NGF-β, allein oder in Kombination. Die Marker wurden mit Hilfe der Flowzytometrie gemessen. Die Expression der Marker in der Mediumkontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Antigenexpression der Zytokin-behandelten Zellen bezieht sich auf diese Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse werden präsentiert als Mittelwert (±SD) von jeweils mindestens vier unabhängigen Messungen. Die mit (\*) oder (\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen eine signifikante Herunterregulation der Mastzellmarker ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ), während (#) auf eine signifikante Hochregulation der Mastzellmarker hinweist ( $p < 0,05$ ).

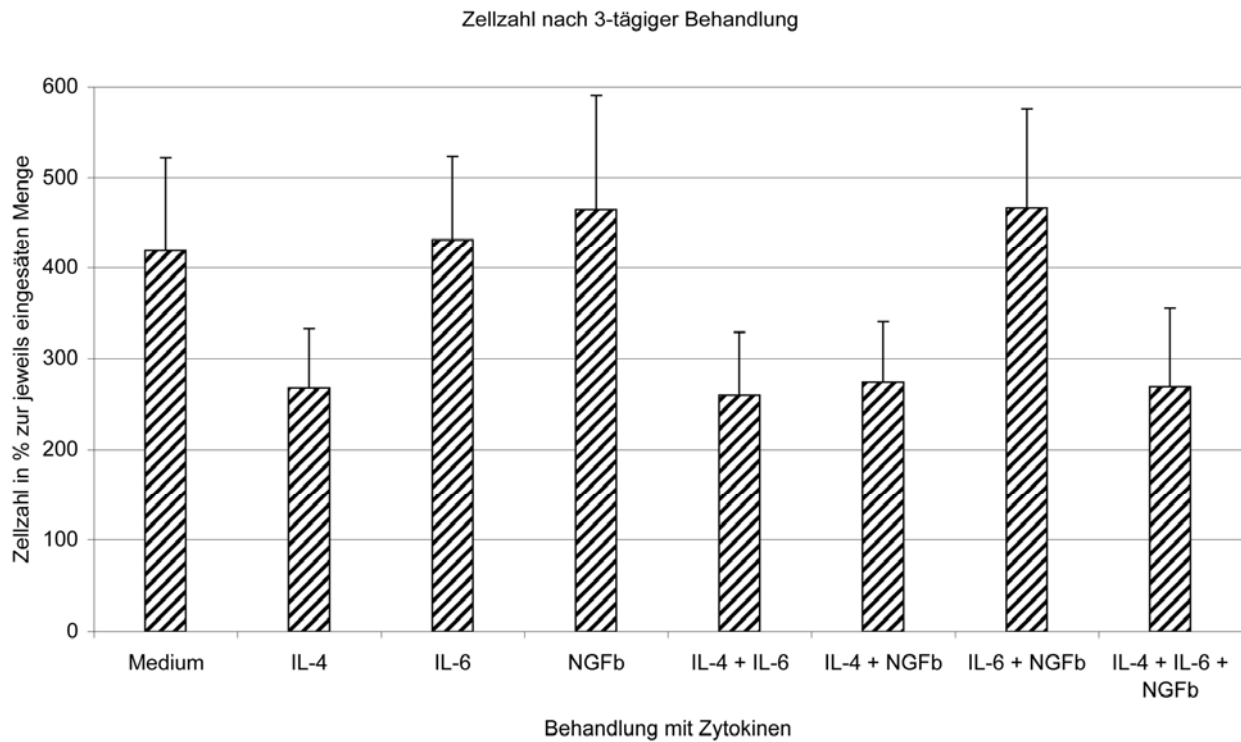


Diagramm 3: Quantitative Bestimmung der Zellzahl der HMC-1 5C6 Zellen, dargestellt in % zur jeweils eingesäten Zellzahl, gemessen nach dreitägiger Inkubation mit Zytokinen. Ergebnisse zeigen die Mittelwerte ( $\pm$ SD) von acht unabhängigen Messungen. Alle IL-4-haltigen Messungen zeigen eine signifikante Zellzahlverminderung ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.4 Einfluss von IL-4 auf humane Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade

Zu Beginn dieser Arbeit standen der Forschung ausschließlich die Zelllinien HMC-1 und HMC-1 5C6 zur Verfügung (siehe Kapitel 4.2). 2003 etablierte die Arbeitsgruppe von Dr. Metcalfe eine neue Zelllinie von einem Patienten mit Mastzellsarkom, die ein beinahe unerschöpfliches Reservoir einer SCF-abhängigen Mastzelllinie darstellt. Diese LAD 2 genannte Mastzelllinie repräsentiert ein intermediäres Entwicklungsstadium zwischen HMC-1 5C6 und KMZ (Kirshenbaum *et al.* 2003).

Fortan standen unserem Labor drei Mastzellsysteme unterschiedlichen Reifegrades zur Verfügung: HMC-1 5C6, LAD 2 und KMZ. Mittels dieser drei Systeme konnte nun untersucht werden, ob die IL-4-vermittelten Effekte abhängig vom Differenzierungsgrad (bzw. Proliferationspotential) der Mastzelle sind. Dazu wurden die Zellen drei Tage in IL-4-haltigem Medium kultiviert und anschließend die Mastzellmarker c-kit und FcεRIα mit Hilfe der Flowzytometrie gemessen (Abbildung 7) und statistisch ausgewertet (Tabelle 8). Während sich bei KMZ weder die Expression von FcεRIα noch von c-kit durch IL-4 beeinflussbar zeigt, wiesen LAD 2 Zellen einen klaren Trend in Richtung Herunterregulation des SCF-Rezeptors, nicht aber von FcεRIα auf, ohne jedoch statistisch ein signifikantes Ergebnis zu liefern. Eine Herunterregulation beider Marker war wie schon bei den vorangegangenen Versuchen bei HMC-1 5C6 Zellen zu messen. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass FcεRIα von vornherein in nur sehr geringem Maße exprimiert wird. Interessant waren auch die Effekte von IL-4 auf die Proliferation (Tabelle 8). So bestätigte sich abermals der antiproliferative (oder proapoptotische) Effekt von IL-4 bei proliferierenden HMC-1 5C6 Zellen. In geringerem Maße galt dies auch für die schwächer proliferierenden LAD 2 Zellen, jedoch nicht für KMZ. Deren Überlebensrate – KMZ proliferieren nicht – wurde signifikant verlängert. Dieser Effekt wurde in der Literatur bereits beschrieben und wird in der Diskussion genauer erörtert.

Zusammenfassend zeigte IL-4 eine starke Herunterregulierung des SCF-Rezeptors c-kit, die mit zunehmender Differenzierung der Mastzelle abnahm und bei KMZ nicht mehr nachweisbar war. Dem Negativeffekt von IL-4 auf die Zellzahlentwicklung der Mastzelllinien stand eine lebensverlängernde Wirkung bei KMZ gegenüber.

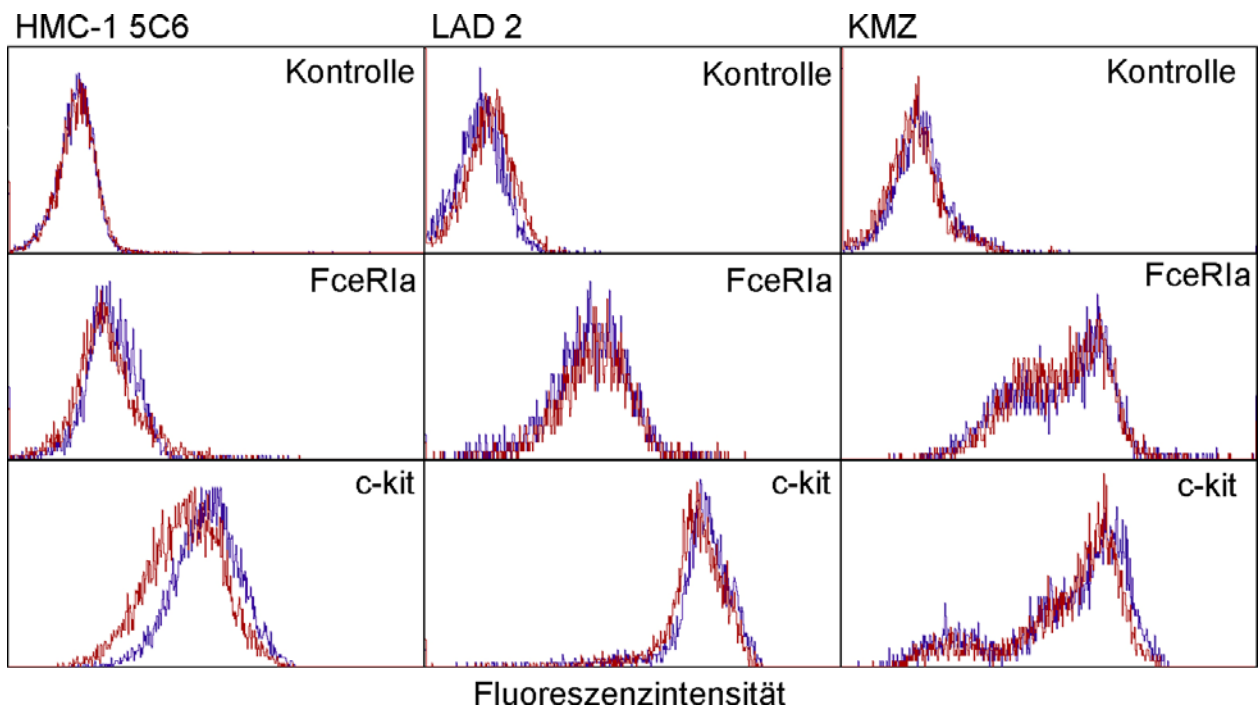


Abbildung 7: Expression der Mastzellmarker auf der Zelloberfläche: FcεR1α und c-kit gemessen mit Hilfe der Flowzytometrie nach dreitägiger Inkubation mit IL-4. Dargestellt sind die drei Mastzellsysteme HMC-1 5C6 Zellen (links), LAD 2 Zellen (Mitte) und KMZ (rechts). Die obere Zeile zeigt die Isotypkontrolle. Die rote Kurve entspricht den IL-4-behandelten Zellen, die Blaue der Mediumkontrolle.

Tabelle 8: Zusammengefasst sind die Effekte von IL-4 auf die Expression der Mastzellmarker FcεRIα und c-kit sowie auf die Veränderung der Zellzahl. Die drei Mastzellsysteme HMC-1 5C6, LAD 2 und KMZ wurden drei Tage mit IL-4 inkubiert. Die Zellzahl ist angegeben in % zur eingesäten Zellzahl; die Proteinexpression der IL-4-behandelten Zellen ist in % zur Mediumkontrolle dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte (±SD) von jeweils drei bis sechs unabhängigen Messungen. Die mit (\*) oder (\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Kontrolle (p<0,05 bzw. p<0,01), während (#) auf einen signifikant höheren Wert hinweist (p<0,05).

		FcεRIα	c-kit	Zellzahl
HMC-1 5C6	Medium	100	100	458 ±86
	IL-4	75,2 ±14,4*	70,2 ±8,7**	267 ±75**
LAD 2	Medium	100	100	134 ±14
	IL-4	102,6 ±5,9	87,8 ±9,0	114 ±11*
KMZ	Medium	100	100	82,7 ±4,5
	IL-4	103,4 ±1,5	95,3 ±5,3	90,0 ±6,0#

### 4.3 Einfluss von ATRA auf humane Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade

Um den Einfluss von ATRA auf die drei Mastzellsysteme HMC-1 5C6, LAD 2 und KMZ zu untersuchen, wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Standardmedium und dem Zusatz von ATRA kultiviert. Während HMC-1 5C6 Zellen wegen der stark antiproliferativen Effekte und, nach längeren Zeiten, sogar wegen eines beschleunigten Zelltodes drei Tage inkubiert wurden, wurde die Inkubation von LAD 2 Zellen und KMZ auf sieben Tage ausgedehnt, nachdem in Vorversuchen ermittelt wurde, dass die unten beschriebenen Effekte nach drei Tagen zwar nachweisbar, nach sieben Tagen jedoch maximal waren (Ergebnisse nicht dargestellt).

Zunächst sollen die Einflüsse von ATRA auf die Proliferation und das Überleben der Mastzellen beschrieben werden. Anschließend wird der Effekt von ATRA auf die Differenzierungsmarker c-kit, Tryptase, Chymase, FcεRIα, FcεRIβ, FcεRIγ und HDC auf Protein- und mRNA-Ebene ausführlich erörtert.

#### 4.3.1 Einfluss von ATRA auf Proliferation und Überleben

ATRA hat starken Einfluss auf die Proliferation und Überlebensdauer von Zellen der myeloischen Reihe, wie in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Versuchen gezeigt werden konnte.

An dieser Stelle sollen die Einflüsse von ATRA auf die Mastzelle genauer untersucht und dargestellt werden. Wie im vorangegangenen Abschnitt waren auch im zweiten Teil dieser Arbeit drei Mastzellsysteme Gegenstand der Untersuchung. Die stark proliferierenden HMC-1 5C6 Zellen stehen den schwach proliferierenden LAD 2 Zellen gegenüber, während KMZ keine mitotische Aktivität besitzen, sich aber mit rhSCF Zusatz in Medium kultivieren lassen.

Bei HMC-1 5C6 Zellen bewirkte ATRA einen Rückgang der Zellzahl um mehr als 40% im Vergleich zur Mediumkontrolle, während LAD 2 Zellen einen negativen Einfluss von ATRA von knapp 10% aufwiesen. Das Überleben von KMZ hingegen wurde durch ATRA nicht beeinflusst. Eine signifikante Zellgrößenveränderung, gemessen am Zelldurchmesser, konnte nur bei HMC-1 5C6 Zellen unter ATRA-Behandlung im Vergleich zur Mediumkontrolle nachgewiesen werden, obgleich eine ähnliche Tendenz auch bei LAD 2 Zellen und KMZ erkennbar war (Tabelle 9). Bei Untersuchungen der Zellzahl nach einer bestimmten Behandlung, wie in diesem Falle nach Behandlung mit ATRA, kommen zwei Aspekte zum Tragen, die die Zellzahl verändern können. Zum einen kann durch Variation der mitotischen Aktivität der Zellen Einfluss auf die Proliferation ausgeübt werden, zum anderen kann sich die Überlebensdauer der Zellen verändern, was einem frühzeitig induzierten Zelltod gleichkommt. Ob ATRA den Zelltod von HMC-1 5C6 und LAD 2 Zellen beschleunigt, wurde nachfolgend getestet. Dies wurde mit der YoPro-Methode bewerkstelligt, die den Prozentsatz vitaler, nekrotischer und apoptotischer Zellen aufgrund einer unterschiedlichen Penetration der drei Zellstadien mit bestimmten Farbstoffen



durchflusszytometrisch ermitteln kann. Das Ergebnis zeigte, dass ATRA keinerlei Zelltod induzierenden Effekt besitzt und die ATRA-vermittelte Reduktion der Zellzahl von HMC-1 5C6 und LAD 2 Zellen daher wahrscheinlich auf antiproliferativen Eigenschaften, nicht aber auf einer beschleunigten Sterberate beruht (Ergebnisse nicht dargestellt).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ATRA bei proliferierenden Mastzellen negativ in die Zellzyklusprogression eingreift aber keinen Einfluss auf das Überleben nicht-proliferierender Mastzellen ausübt.

Tabelle 9: Effekte von ATRA auf die Proliferation und Morphologie der drei Mastzellsysteme. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von n=8 (HMC-1 5C6 Zellen), n=5 (LAD 2 Zellen) und n=6 (KMZ) unabhängigen Messungen. Die Zellzahl ist in % zur eingesäten Zellzahl angegeben. Die mit (\*) oder (\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Kontrolle ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ).

		Zellzahl	Durchmesser ( $\mu$ m)
HMC-1 5C6	Medium	480,6 $\pm$ 68,6	16,6 $\pm$ 0,1
	ATRA	283,0 $\pm$ 64,5**	15,8 $\pm$ 0,1**
LAD 2	Medium	148,8 $\pm$ 9,4	14,1 $\pm$ 1,2
	ATRA	134,4 $\pm$ 9,3*	13,8 $\pm$ 1,4
KMZ	Medium	72,1 $\pm$ 13,3	11,9 $\pm$ 0,6
	ATRA	71,8 $\pm$ 3,5	11,7 $\pm$ 0,7

#### 4.3.2 Einfluss von ATRA auf die Expression von c-kit

Bei den Untersuchungen der Einflüsse von ATRA auf die Mastzelle zeigte das Retinoid einen starken Effekt auf den SCF-Rezeptor c-kit aller drei Zellsysteme. So ergaben die Untersuchungen eine Herunterregulation des Proteins um mehr als die Hälfte infolge der ATRA-Behandlung (Abbildung 8 und Tabelle 10). Betrachtet man die drei Zellsysteme einzeln, nahm die Stärke der Herunterregulation mit dem Reifegrad zu. So ist der SCF-Rezeptor bei differenzierten KMZ am stärksten herunterreguliert, gefolgt von LAD 2 Zellen und schließlich den HMC-1 5C6 Zellen, bei denen dieser Effekt bereits in der Literatur beschrieben wurde (Nilsson *et al.* 1994a, Hjertson *et al.* 2003).

Betrachtet man die Entwicklung dieser Effekte an der Zelloberfläche auf mRNA-Niveau, so sind die Ergebnisse weniger stark ausgeprägt, aber dennoch für LAD 2 Zellen und KMZ deutlich sichtbar (Abbildung 9 und Tabelle 11). Bei HMC-1 5C6 Zellen war jedoch überhaupt kein signifikanter Effekt erkennbar, obgleich das c-kit-Protein – wie oben ausgeführt – stark abnahm.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der SCF-Rezeptor c-kit mit einer starken Herunterregulation auf die ATRA-Behandlung reagiert und bei differenzierten KMZ am stärksten ist. Dieser Effekt ist auf Proteinebene auffallender als auf mRNA-Niveau.

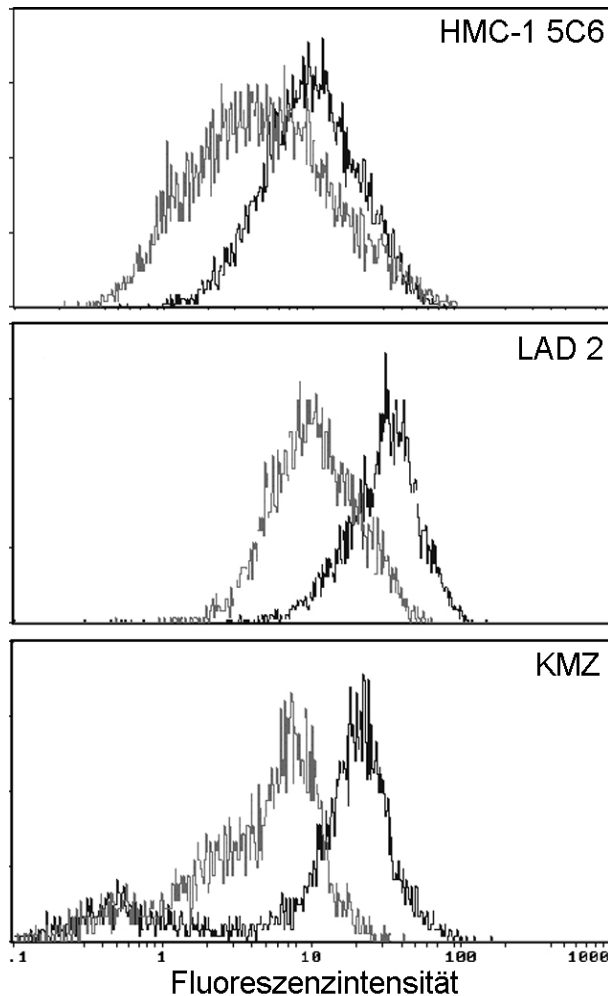


Abbildung 8: Expression des Mastzellmarkers c-kit auf der Zelloberfläche. Die Zellen wurden mit ATRA behandelt und nach drei Tagen (HMC-1 5C6 Zellen, oben) bzw. sieben Tagen (LAD 2 Zellen, Mitte und KMZ, unten) mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Schwarz: c-kit-Expression in der Mediumkontrolle. Grau: c-kit-Expression nach ATRA-Behandlung.

Tabelle 10: Quantitative Darstellung der c-kit-Expression nach ATRA-Behandlung. Die Expression von c-kit ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von n=7 (HMC-1 5C6 Zellen), n=4 (LAD 2 Zellen) und n=5 (KMZ) unabhängigen Messungen. Die mit (\*\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Kontrolle ( $p < 0,001$ ).

	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
Proteinexpression ( $\pm$ SD)	47,2 $\pm$ 7,2***	41,3 $\pm$ 4,5***	37,4 $\pm$ 6,6***

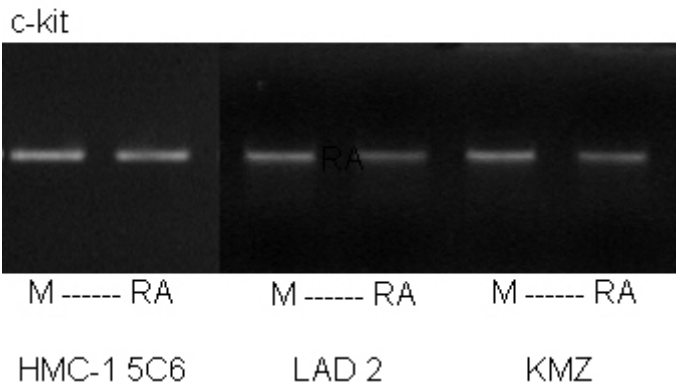


Abbildung 9: Photo eines RT-PCR-Gels. Darstellung der c-kit-spezifischen mRNA. Abgebildet sind die ‚Pärchen‘ (Medium [M] vs. ATRA [RA]) der drei untersuchten Mastzellsysteme HMC-1 5C6 Zellen (links), LAD 2 Zellen (Mitte) und KMZ (rechts).

Tabelle 11: Semi-quantitative Erfassung der RT-PCR-Resultate von c-kit. Die Konzentration des PCR-Produkts wurde mittels Computersoftware erfasst. Die mRNA-Expression von c-kit ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von n=21 (HMC-1 5C6 Zellen), n=7 (LAD 2 Zellen) und n=8 (KMZ) unabhängigen Messungen. Die mit (\*) und (\*\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Mediumkontrolle ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ).

	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
mRNA-Expression ( $\pm$ SD)	84,1 $\pm$ 8,8	79,8 $\pm$ 5,5*	61,0 $\pm$ 8,1***

#### 4.3.3 Einfluss von ATRA auf die Expression der Tryptase

Tryptase ist – neben der Chymase – eine von zwei mastzellspezifischen Serinendoproteasen und wird von allen drei Mastzellsystemen, die Gegenstand dieser Arbeit waren, exprimiert. Betrachtet man zunächst die Effekte am Protein selbst, so zeigten alle drei Zellsysteme eine Herunterregulation, die jedoch bei weitem nicht so eindrucksvoll ausgeprägt war wie bei c-kit (Abbildung 10 und Tabelle 12). Die zunehmende Stärke der Herunterregulation hatte jedoch die gleiche Tendenz. Die Effekte waren bei KMZ mit einer fast 30%igen Herunterregulation des Proteins stärker als bei LAD 2 Zellen und am schwächsten bei HMC-1 5C6 Zellen. Setzt man den Grad der Herunterregulation der Tryptase ins Verhältnis zur Stärke der basalen Proteinexpression in den Granula, so fällt auf, dass der Effekt stärker bei Tryptase-hochoxprimierenden Mastzellen war also bei KMZ. Auch innerhalb einer Zellpopulation war dies erkennbar. So sieht man sowohl bei HMC-1 5C6 als auch bei LAD 2 Zellen eine Verschiebung der grauen ATRA- gegen die schwarze Medium-Kurve verstärkt im rechten Teil des Histogramms, also im Bereich der hochoxprimierenden Zellen.

Verhältnismäßig stark war die Herunterregulation auf transkriptioneller Ebene. So zeigten alle drei Mastzellsysteme eine erhebliche Herunterregulation der mRNA-Konzentration, wobei kein auffälliger Unterschied bei den verschiedenen Reifegraden auszumachen war (Abbildung 11 und Tabelle 13).

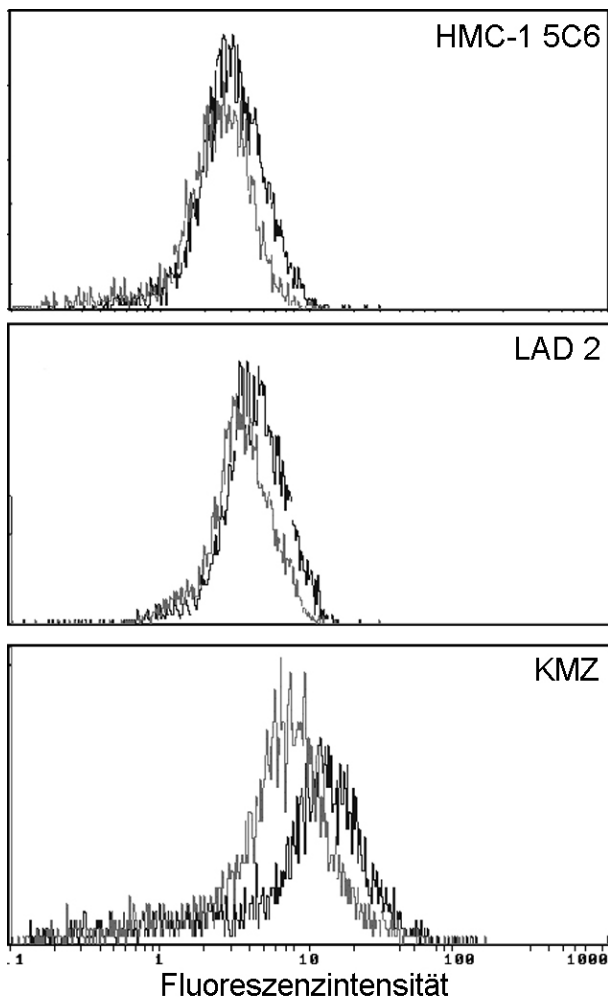


Abbildung 10: Expression des Mastzellmarkers Tryptase nach Permeabilisierung der Zellmembran. Die Zellen wurden mit ATRA behandelt und nach drei Tagen (HMC-1 5C6 Zellen, oben) bzw. sieben Tagen (LAD 2 Zellen, Mitte und KMZ, unten) mit Hilfe der Flowzytometrie gemessen. Schwarz: Tryptase-Expression in der Mediumkontrolle. Grau: Tryptase-Expression nach ATRA-Behandlung.

Tabelle 12: Quantitative Darstellung der Tryptase-Expression nach ATRA-Behandlung. Die Expression der Tryptase ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von n=6 (HMC-1 5C6 Zellen), n=4 (LAD 2 Zellen) und n=5 (KMZ) unabhängigen Messungen. Die mit (\*), (\*\*) oder (\*\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Mediumkontrolle ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ).

	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
Proteinexpression ( $\pm$ SD)	79,7 $\pm$ 10,2**	77,5 $\pm$ 10,6*	72,1 $\pm$ 3,3***

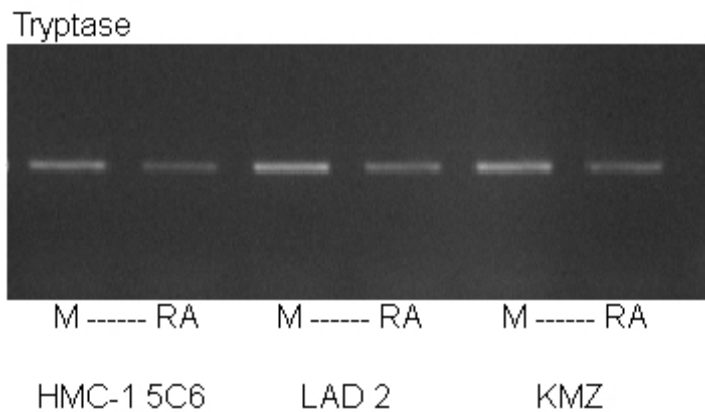


Abbildung 11: Photo eines RT-PCR-Gels. Darstellung der Tryptase-spezifischen mRNA. Abgebildet sind die ‚Pärchen‘ (Medium [M] vs. ATRA [RA]) der drei untersuchten Mastzellsysteme HMC-1 5C6 Zellen (links), LAD 2 Zellen (Mitte) und KMZ (rechts).

Tabelle 13: Semi-quantitative Erfassung der RT-PCR-Resultate von Tryptase. Die Konzentration des PCR-Produkts wurde mittels Computersoftware erfasst. Die mRNA-Expression von Tryptase ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von n=21 (HMC-1 5C6 Zellen), n=7 (LAD 2 Zellen) und n=8 (KMZ) unabhängigen Messungen. Die mit (\*\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Mediumkontrolle ( $p < 0,001$ ).

	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
mRNA-Expression ( $\pm$ SD)	58,7 $\pm$ 3,8***	55,9 $\pm$ 3,6***	51,9 $\pm$ 3,9***

#### 4.3.4 Einfluss von ATRA auf die Expression der Chymase

Die zweite wichtige Serinprotease ist die Chymase, ebenfalls ein typisches Charakteristikum für bestimmte Mastzellen. Wie die Tryptase wird auch die Chymase in zytoplasmatischen Granula gespeichert und bei allergischen Prozessen von der Mastzelle freigesetzt. Zur Messung des Proteins müssen die Mastzellen vor der Antikörpermarkierung ebenfalls fixiert und permeabilisiert werden.

Im Gegensatz zur Tryptase wird die zweite Endoprotease nur von KMZ nicht, aber von LAD 2 Zellen und HMC-1 5C6 Zellen gebildet (Abbildung 12 und Tabelle 14). Interessanterweise konnte allerdings neben KMZ auch für LAD 2 Zellen eine transkriptionelle Aktivität festgestellt werden und folglich auch der Effekt von ATRA auf diese untersucht werden (Abbildung 13 und Tabelle 15).

Betrachtet man zunächst die Produktseite, also das Protein, so wiesen KMZ eine leichte Herunterregulation der Chymase auf. Erstaunlicher aber war die extrem starke Herunterregulation der mRNA durch die ATRA-Behandlung. Sowohl LAD 2 Zellen als auch KMZ zeigten – bezogen auf die gesamte Arbeit – die stärkste Abnahme der Chymase-spezifischen mRNA-Konzentration nach ATRA-Behandlung dicht gefolgt von der Tryptase.



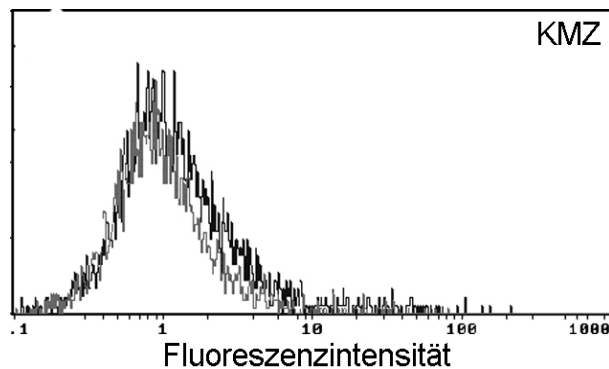


Abbildung 12: Expression des Mastzellmarkers Chymase nach Permeabilisierung der Zellmembran. Nur KMZ verfügen über mit Chymase gefüllte Granula. Die KMZ wurden sieben Tage mit ATRA behandelt und mit Hilfe der Flowzytometrie gemessen. Schwarz: Chymase-Expression in der Mediumkontrolle. Grau: Chymase-Expression nach ATRA-Behandlung.

Tabelle 14: Quantitative Darstellung der Chymase-Expression nach ATRA-Behandlung. Die Expression der Chymase ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von  $n=3$  (HMC-1 5C6 Zellen und LAD 2 Zellen) und  $n=7$  (KMZ) unabhängigen Messungen. Das mit (\*) gekennzeichnete Ergebnis zeigt einen signifikant niedrigeren Werte als die Mediumkontrolle ( $p<0,05$ ).

	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
Proteinexpression ( $\pm$ SD)	nicht detektierbar		81,6 $\pm$ 11,8*

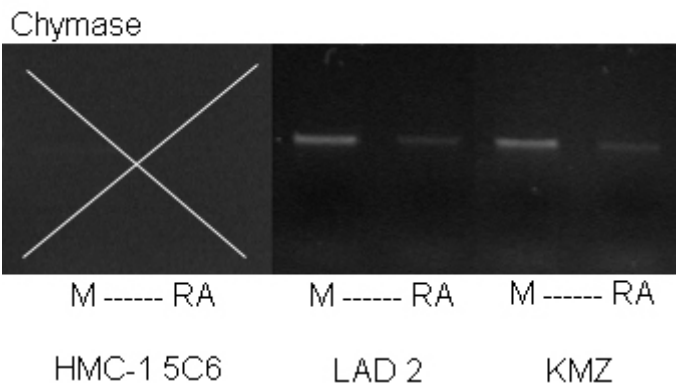


Abbildung 13: Photo eines RT-PCR Gels. Darstellung der Chymase-spezifischen mRNA. Abgebildet sind die ‚Pärchen‘ (Medium [M] vs. ATRA [RA]) der beiden auf mRNA-Ebene Chymase-exprimierenden Mastzellensysteme LAD 2 Zellen (links) und KMZ (rechts). Das weiße Kreuz weist auf eine mangelnde mRNA-Expression hin.

Tabelle 15: Semi-quantitative Erfassung der RT-PCR-Resultate von Chymase. Die Konzentration des PCR-Produkts wurde mittels Computersoftware erfasst. Die mRNA-Expression von Chymase ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von n=3 (HMC-1 5C6 Zellen), n=6 (LAD 2 Zellen) und n=7 (KMZ) unabhängigen Messungen. Die mit (\*\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Mediumkontrolle ( $p < 0,001$ ).

	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
mRNA-Expression ( $\pm$ SD)	nicht detektierbar	52,4 $\pm$ 5,5***	41,1 $\pm$ 4,8***

#### 4.3.5 Einfluss von ATRA auf die Expression von FcεRI (α, β, γ)

Der hochaffine IgE-Rezeptor FcεRI ist aus drei verschiedenen Untereinheiten (in der Zusammensetzung αβγγ) aufgebaut und Andockstelle für das Fc-Fragment des Immunglobulins IgE.

Die α-Untereinheit FcεRIα bindet den Fc-Teil des IgE. Die β- und γ-Untereinheiten bilden eine der α-Untereinheit angeschlossene Funktionseinheit und vermitteln ihre Signale in das Zellinnere. Dabei ist die β-Untereinheit für die Zusammensetzung des Komplexes nicht zwingend notwendig und nicht bei allen FcεRI-Rezeptoren nachweisbar.

Wie zu Beginn des Ergebnisteils dieser Arbeit beschrieben, exprimieren alle drei Zellsysteme die α-Untereinheit des FcεRI-Rezeptors. Die Expression der α-Kette wurde entweder direkt auf der Zelloberfläche, also superfiziell (LAD 2 Zellen und KMZ), oder intrazellulär im Zytoplasma (HMC-1 5C6 Zellen) mit Hilfe der Flowzytometrie gemessen. Eine Herunterregulation der α-Untereinheit erfolgte in allen drei Zellsystemen (Abbildung 14 und Tabelle 16). Der stärkste Effekt wurde bei KMZ gemessen, gefolgt von LAD 2 Zellen und HMC-1 5C6 Zellen. Dieser graduelle Effekt konnte auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden. So wurde die α-spezifische mRNA nach ATRA-Behandlung im Vergleich zur Mediumkontrolle in allen drei Mastzellsystemen herunterreguliert, und dies mit zunehmendem Effekt bei höherer Mastzelldifferenzierung (Abbildung 15 und Tabelle 17).

Auf transkriptioneller Ebene wurde der Einfluss von ATRA nicht nur auf die α-Untereinheit sondern auch auf die β- und γ-Ketten des FcεRI-Rezeptors untersucht. Im Gegensatz zur α-Untereinheit wird die mRNA der β-Untereinheit nur von LAD 2 Zellen und KMZ exprimiert (Abbildung 15 und Tabelle 18). Dabei konnte kein Effekt von ATRA bei den LAD 2 Zellen festgestellt werden. Bei KMZ wurde eine mäßige, dennoch signifikante Herunterregulation der β-Kette gemessen. Die mRNA der γ-Untereinheit des FcεRI-Rezeptors wurde in allen drei Mastzellsystemen nach ATRA-Behandlung herunterreguliert, ohne nennenswerte Unterschiede zwischen den Mastzellarten (Abbildung 15 und Tabelle 19).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Einflüsse von ATRA auf den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI den erkennbaren Negativeinfluss auf andere gemessene Proteine bestätigt und im wesentlichen über eine Herunterregulation der α- und γ-Untereinheit vermittelt sein dürfte. Die Ergebnisse auf transkriptioneller Ebene konnten auf Proteinniveau bestätigt werden.

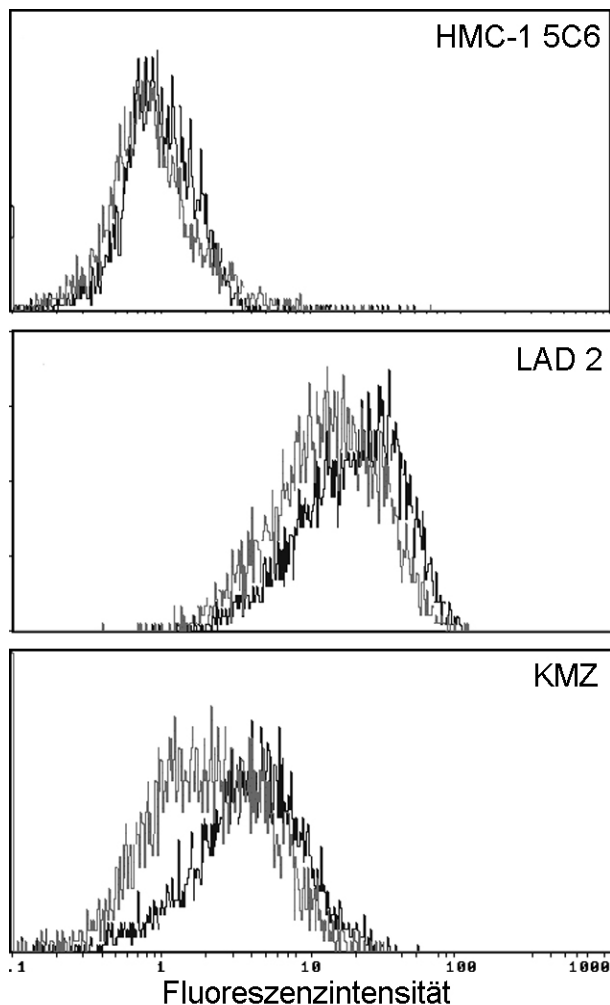


Abbildung 14: Expression von FcεRIα bei intrazellulärer Erfassung nach Permeabilisierung (HMC-1 5C6 Zellen) und auf der Zelloberfläche (LAD 2 Zellen und KMZ). Die Zellen wurden mit ATRA behandelt und nach drei Tagen (HMC-1 5C6 Zellen, oben) bzw. sieben Tagen (LAD 2 Zellen, Mitte und KMZ, unten) mit Hilfe der Flowzytometrie gemessen. Schwarz: FcεRIα-Expression in der Mediumkontrolle. Grau: FcεRIα-Expression nach ATRA-Behandlung.

Tabelle 16: Quantitative Darstellung der FcεRIα-Expression nach ATRA-Behandlung. Die Expression von FcεRIα ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von n=6 (HMC-1 5C6 Zellen), n=5 (LAD 2 Zellen) und n=7 (KMZ) unabhängigen Messungen. Die (\*) oder (\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Mediumkontrolle ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ).

	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
Proteinexpression ( $\pm$ SD)	89,0 $\pm$ 6,4**	74,9 $\pm$ 8,9**	64,1 $\pm$ 16,4*

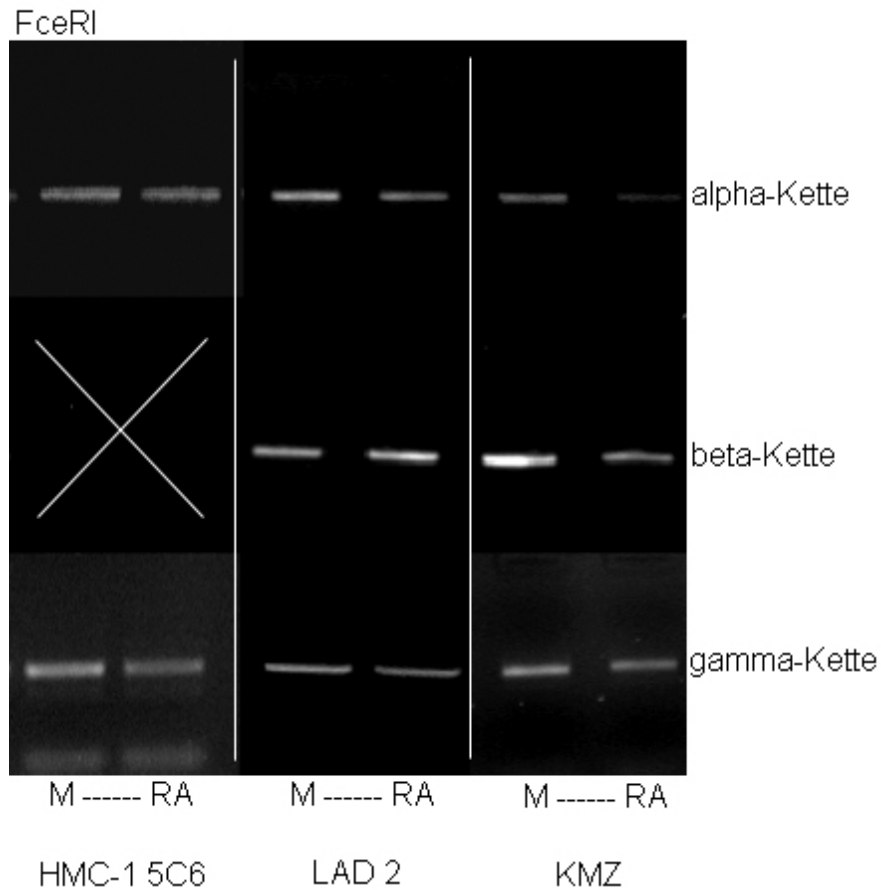


Abbildung 15: Photo von RT-PCR-Gelen. Darstellung der FcεRI-spezifischen mRNA: FcεRIα (oben), FcεRIβ (Mitte) und FcεRIγ (unten). Abgebildet sind jeweils die ‚Pärchen‘ (Medium [M] vs. ATRA [RA]) der drei untersuchten Mastzellsysteme HMC-1 5C6 Zellen (links), LAD 2 Zellen (Mitte) und KMZ (rechts). Das weiße Kreuz weist auf eine mangelnde mRNA-Expression hin.

Tabelle 17: Semi-quantitative Erfassung der RT-PCR-Resultate von FcεRIα. Die Konzentration des PCR-Produkts wurde mittels Computersoftware erfasst. Die mRNA-Expression von FcεRIα ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte (±SD) von n=11 (HMC-1 5C6 Zellen), n=6 (LAD 2 Zellen) und n=7 (KMZ) unabhängigen Messungen. Die mit (\*\*) oder (\*\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Mediumkontrolle (p<0,01 bzw. p<0,001).

FcεRIα	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
mRNA-Expression (±SD)	96,3 ±10,5	65,8 ±7,9**	46,5 ±4,2***

Tabelle 18: Semi-quantitative Erfassung der RT-PCR-Resultate von FcεRIβ. Die Konzentration des PCR-Produkts wurde mittels Computersoftware erfasst. Die mRNA-Expression von FcεRIβ ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte (±SD) von n=3 (HMC-1 5C6 Zellen), n=6 (LAD 2 Zellen) und n=7 (KMZ) unabhängigen Messungen. Das mit (\*\*) gekennzeichnete Ergebnis zeigt einen signifikant niedrigeren Wert als die Mediumkontrolle (p<0,01).

FcεRIβ	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
mRNA-Expression (±SD)	nicht detektierbar	100,8 ±11,7	74,6 ±7,1**

Tabelle 19: Semi-quantitative Erfassung der RT-PCR-Resultate von FcεRIγ. Die Konzentration des PCR-Produkts wurde mittels Computersoftware erfasst. Die mRNA-Expression von FcεRIγ ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte (±SD) von n=6 (HMC-1 5C6 Zellen), n=6 (LAD 2 Zellen) und n=8 (KMZ) unabhängigen Messungen. Die mit (\*\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Mediumkontrolle (p<0,001).

FcεRIγ	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
mRNA-Expression (±SD)	68,0 ±4,9***	72,1 ±3,2***	69,6 ±6,0***

#### 4.3.6 Einfluss von ATRA auf die Expression der Histidindecaboxylase

Die Histidindecaboxylase (HDC) ist ein Schlüsselenzym der Histaminsynthese. Es reguliert den Gehalt an Histamin in den Granula der Mastzelle. Histamin und damit die Histidindecaboxylase ist ein typisches Merkmal der Mastzelle, wobei ersteres ähnlich den Serinendoproteasen nach rezeptorvermittelter Stimulation exozytiert wird. Gemessen wurde der Einfluss von ATRA auf die mRNA-Synthese der HDC. Eine Behandlung mit ATRA zeigte keinen Effekt, weder auf die HDC-spezifische mRNA-Synthese unreifer HMC-1 5C6 Zellen noch auf intermediär differenzierte LAD 2 Zellen noch differenzierte KMZ (Abbildung 16 und Tabelle 20). Die HDC konnte durch ATRA nicht beeinflusst werden.

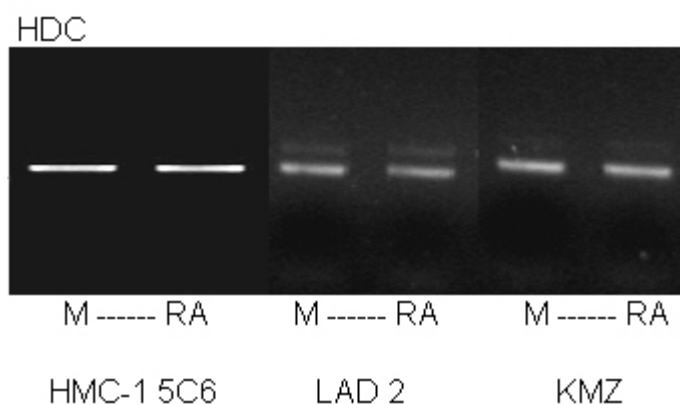


Abbildung 16: Photo eines RT-PCR Gels. Darstellung der HDC-spezifischen mRNA. Abgebildet sind die Pärchen (Medium [M] vs. ATRA [RA]) der drei untersuchten Mastzellsysteme HMC-1 5C6 Zellen (links), LAD 2 Zellen (Mitte) und KMZ (rechts).

Tabelle 20: Semi-quantitative Erfassung der RT-PCR-Resultate von HDC. Die Konzentration des PCR-Produkts wurde mittels Computersoftware erfasst. Die mRNA-Expression von HDC ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von  $n=6$  (HMC-1 5C6 Zellen),  $n=6$  (LAD 2 Zellen) und  $n=6$  (KMZ) unabhängigen Messungen.

	HMC-1 5C6	LAD 2	KMZ
mRNA-Expression ( $\pm$ SD)	104 $\pm$ 10,3	95,6 $\pm$ 13,4	104,9 $\pm$ 15,2

Der Einfluss von ATRA auf den Histamingehalt der drei Mastzellsysteme wurde ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe untersucht. Die Ergebnisse entsprechen dem oben beschriebenen Nulleffekt. Keines der drei Mastzellsysteme HMC-1 5C6 Zellen, LAD 2 Zellen oder KMZ wies einen veränderten Histamingehalt nach ATRA-Behandlung auf (Babina *et al.* 2005b).

#### 4.3.7 Zusammenfassender Überblick über die Effekte von ATRA

Dieser zusammenfassende Überblick über die Effekte von ATRA auf die Expression von Differenzierungsmarkern bei den drei Mastzellarten dient sowohl der klaren Gegenüberstellung der unterschiedlichen Effekte von ATRA auf Protein- und mRNA-Ebene als auch der Verdeutlichung der Unterschiede innerhalb der einzelnen Mastzelltypen.

Das Protein c-kit wurde auf allen drei Mastzellsystemen deutlich stärker herunterreguliert als auf mRNA-Ebene (Diagramm 4 und Diagramm 5). Invers zeigten sich die Effekte bei den beiden Serinendoproteasen. In den Zellen, in denen sie exprimiert werden, waren die Einflüsse von ATRA auf die mRNA-Konzentration denen auf Proteinniveau deutlich überlegen und die Herunterregulation somit stärker.

Der Einfluss von ATRA auf die einzelnen Mastzelltypen ist sehr unterschiedlich und in den beiden folgenden Diagrammen dargestellt. So sind die Effekte bei den differenzierten KMZ auf alle Mastzellmarker stärker ausgeprägt als bei LAD 2 und HMC-1 5C6 Zellen. Dies gilt sowohl für die Proteinexpression (Diagramm 4) als auch für die mRNA-Konzentration (Diagramm 5).

Die Ergebnisse der ATRA-Studie sind als Kongressbeitrag vorgestellt (Thienemann *et al.* 2004b) und als Originalarbeit zur Publikation eingereicht worden (Babina *et al.* 2005b).



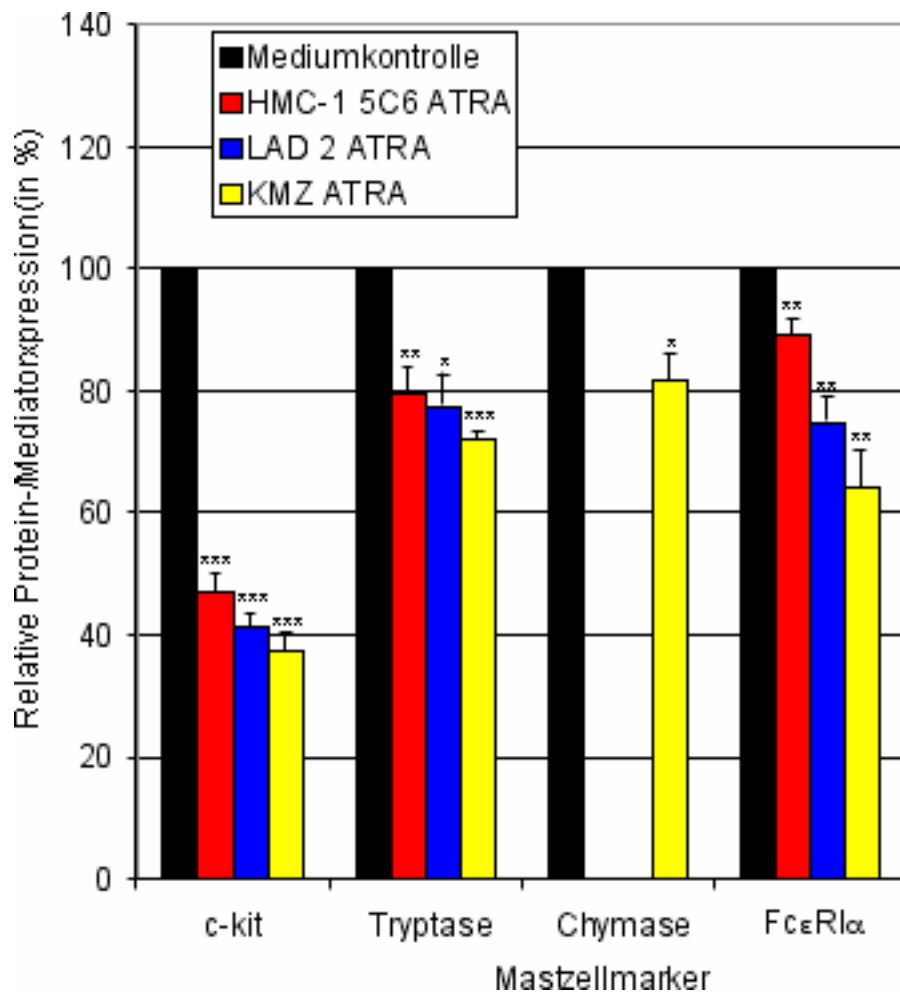


Diagramm 4: Gegenüberstellung der Effekte von ATRA auf die Proteinexpression humaner Mastzellen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von 3-7 unabhängigen Messungen. Die Proteinexpression ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die mit (\*), (\*\*) oder (\*\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Mediumkontrolle ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ).

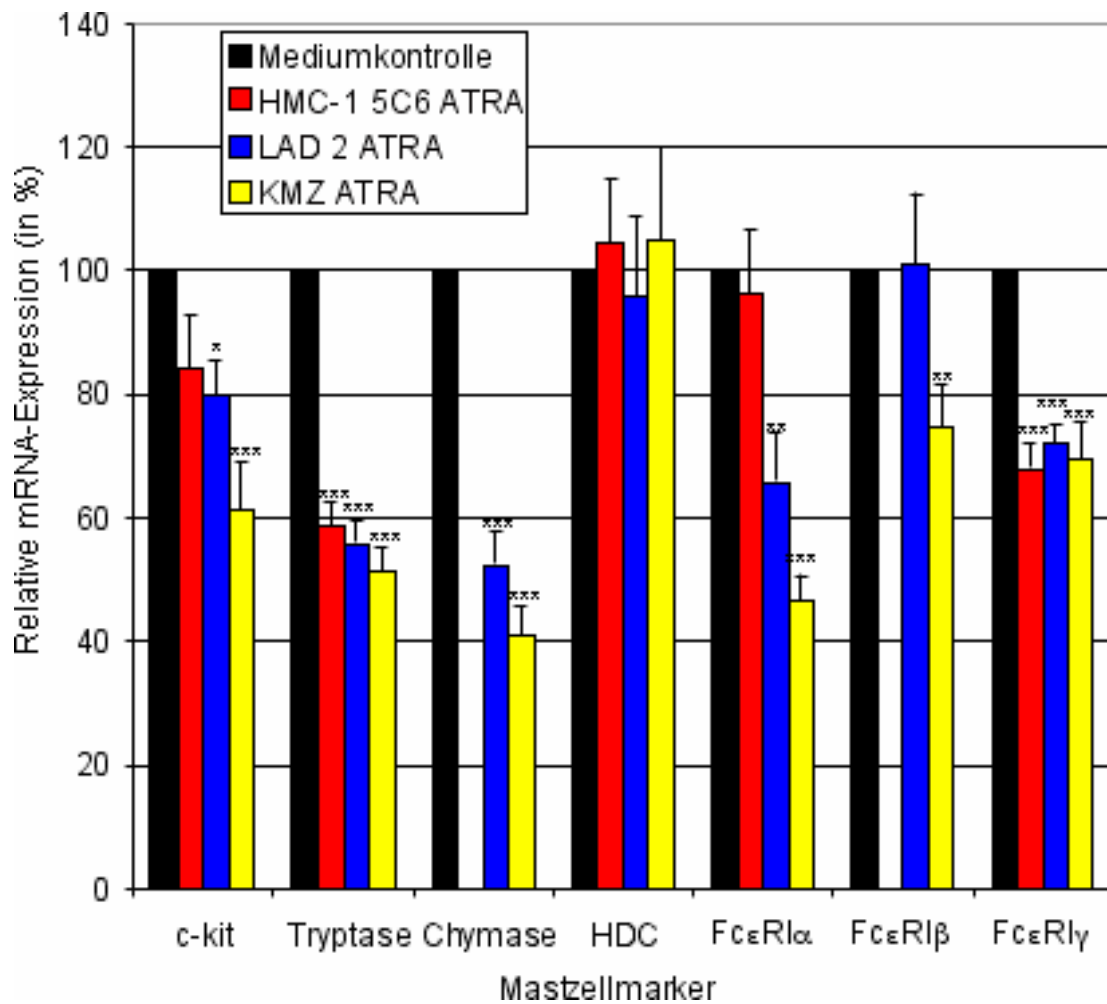


Diagramm 5: Gegenüberstellung der Effekte von ATRA auf die mRNA-Expression humaner Mastzellen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von 3-21 unabhängigen Messungen. Die mRNA-Expression ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die mit (\*), (\*\*) oder (\*\*\*) gekennzeichneten Ergebnisse zeigen signifikant niedrigere Werte als die Mediumkontrolle ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ).

#### 4.3.8 ATRA beeinflusst auf zweifache Weise die Expression von c-kit

Die obigen Ergebnisse für c-kit (siehe auch Kapitel 4.3.2) zeigen, dass wenigstens bei HMC-1 5C6 Zellen eine verminderte Transkriptkonzentration nicht die Ursache der Proteinabnahme sein kann: Nach 3tägiger Inkubation mit ATRA war (im Unterschied zu den beiden anderen verwendeten Zellarten) keine signifikante Abnahme der c-kit-mRNA in HMC-1 5C6 Zellen feststellbar, sehr wohl aber die des Proteins. Es wurde daher angestrebt den Mechanismus dieses Phänomens einzugrenzen. In Frage kamen dabei unter anderem eine proteolytische Abspaltung des c-kit-Rezeptors (*shedding*), eine ATRA-induzierte Internalisierung mit nachfolgender Degradation oder eine veränderte Translationsrate. Die beiden erstgenannten Mechanismen sind im Zusammenhang mit der c-kit-Regulation tatsächlich mehrfach beschrieben worden (Yee *et al.* 1993, Shimizu *et al.* 1996, Cruz *et al.* 2004).

Zunächst wurde eine kinetische Studie angefertigt, um zu ermitteln, zu welchem Zeitpunkt die ATRA-vermittelte c-kit-Herunterregulation erstmals detektierbar ist. Wie in Diagramm 6 dargestellt ist dies nach 16 Stunden der Fall. Auch zu diesem Zeitpunkt ließ sich keinerlei Veränderung der c-kit-mRNA feststellen (nicht dargestellt).

Anschließend wurde dieser Zeitpunkt (also 16 h) herangezogen und die Zellen mit einer Reihe von Inhibitoren fundamentaler Zellfunktionen sowie dem c-kit-Liganden SCF inkubiert. Zu den Inhibitoren zählten Cytochalasin B (das die Zytoskelettfunktion unterdrückt), Cycloheximid (das die translationelle Elongation supprimiert) sowie Proteaseinhibitoren, die die Abspaltung von Rezeptoren durch Ausschalten von Proteaseaktivitäten verhindern. Die Ansätze wurden so gewählt, dass die Zellen entweder nur Medium, nur den besagten Inhibitoren (respektive SCF), nur ATRA oder einer Kombination aus ATRA und den Inhibitoren (bzw. SCF) ausgesetzt wurden.

Mit Ausnahme der Proteaseinhibitoren hemmten alle verwendeten Substanzen die c-kit-Expression erwartetermaßen stark (Daten nicht dargestellt). Das Anliegen hier war jedoch zu ermitteln, an welcher Stelle ATRA ansetzt um die c-kit-Zelloberflächendichte zu minimieren. Dies wurde durch die Bestimmung eines zusätzlichen Einflusses der Substanzen bei Anwesenheit von ATRA bewerkstelligt oder anders ausgedrückt, es wurde untersucht, inwiefern der Effekt von ATRA durch einen der Inhibitoren imitiert wird, so dass der ATRA-Effekt in dem System nicht mehr erkennbar ist. Die Resultate sind in Diagramm 7 dargestellt. Hieraus geht klar hervor, dass nur Cycloheximid den ATRA-Effekt nachzuahmen vermag. Im Falle der anderen Inhibitoren oder von SCF war der Negativeinfluss von ATRA dagegen weiterhin klar erkennbar und daher unabhängig von den durch diese beeinflussten Prozessen. Die bisherigen Daten sind als Kongressbeitrag vorgestellt worden (Thienemann *et al.* 2004b), und die Studien werden im Rahmen einer weiteren Dissertation fortgesetzt.

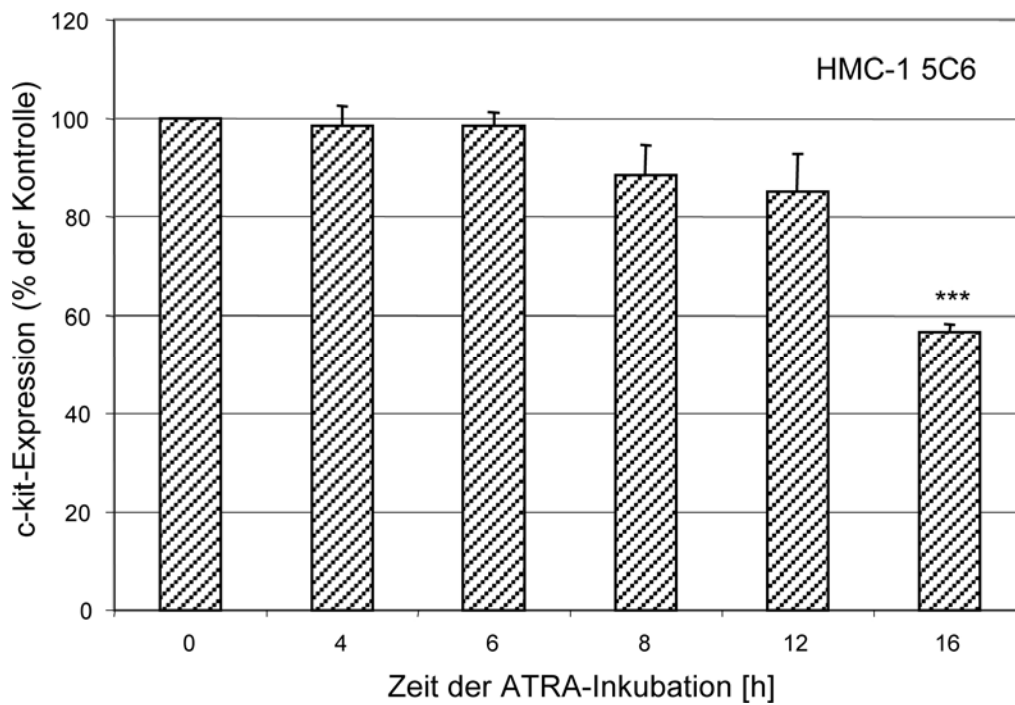


Diagramm 6: Kinetikstudie zur Ermittlung des Zeitpunktes, an dem die Herunterregulation der Proteinexpression von c-kit durch ATRA beginnt. Die Untersuchungen wurden an HMC-1 5C6 Zellen durchgeführt, wobei die c-kit-Expression im Verlauf von 16 Stunden mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen wurde. Die c-kit-Expression ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von 4 unabhängigen Messungen. Das mit (\*\*\*) gekennzeichnete Ergebnis zeigt eine signifikante Herunterregulation der c-kit-Expression ( $p < 0,001$ ).

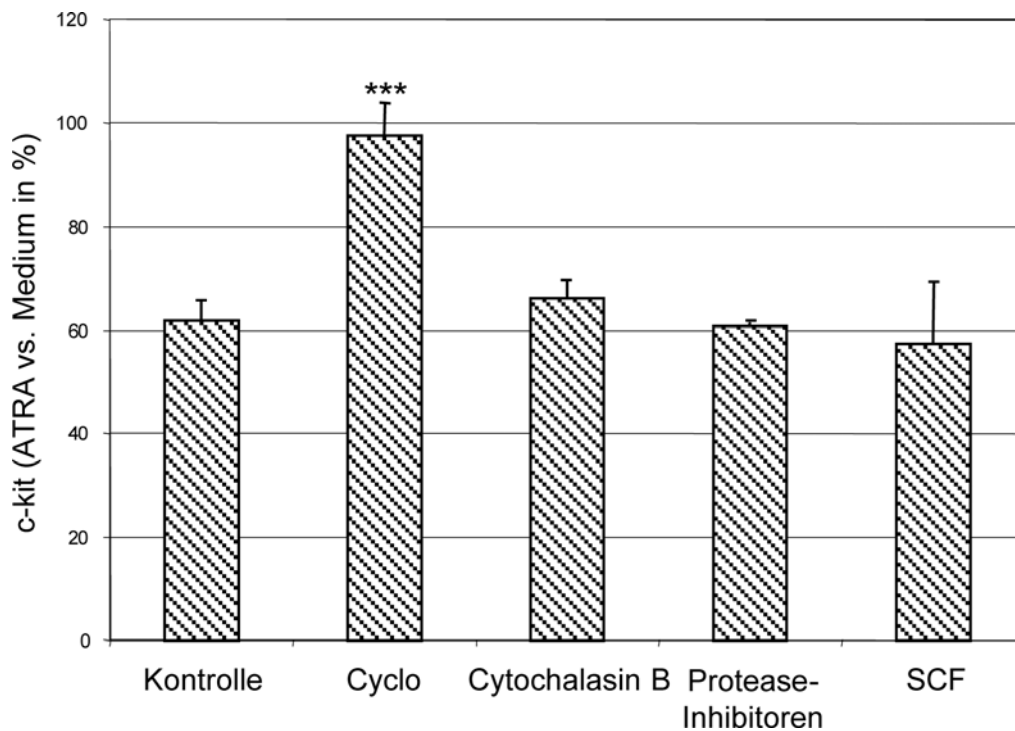


Diagramm 7: Untersuchungen zur Herunterregulation von c-kit während einer 16stündigen Behandlung mit ATRA. Die Zellen wurden entweder mit Medium oder mit ATRA sowie jeweils zusätzlich mit Cycloheximid (Cyclo), Cytochalasin B, Proteaseinhibitoren und SCF behandelt. Die c-kit-Expression ist angegeben im Verhältnis zur Mediumkontrolle (in %). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) von 4-12 unabhängigen Messungen. Das mit (\*\*\*) gekennzeichnete Ergebnis konnte der ATRA-bedingten Herunterregulation von c-kit entgegenwirken ( $p < 0,001$ ).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 IL-4, IL-6, NGF- $\beta$ ohne differenzierenden Effekt auf HMC-1 5C6 Zellen

Ursprünglich standen der Arbeitsgruppe nur zwei Mastzelltypen für Studienzwecke zur Verfügung – wenn man von den Differenzen zwischen dem HMC-1 Subklon 5C6 und der parentalen HMC-1 Zelllinie absieht – um die Effekte von ATRA auf Mastzellen zu untersuchen, nämlich HMC-1 5C6 Zellen und KMZ. Für die Beantwortung der Frage, ob ATRA differenzierende (oder dedifferenzierende) Eigenschaften auf Mastzellen besitzt, und ob diese abhängig von deren Reifegrad sind, war es erforderlich, ein intermediär differenziertes System zu generieren. Um dies zu bewerkstelligen, wurde der Versuch unternommen, neben den unreifen HMC-1 5C6 Zellen und den vollständig differenzierten KMZ, mit Hilfe der Zytokine IL-4 und IL-6 sowie dem Nervenwachstumsfaktor NGF- $\beta$  ein reiferes System zu schaffen (Tabelle 21). Die zwei Zytokine und der Nervenwachstumsfaktor sind an entscheidenden Prozessen der Myelopoese und auch speziell an der Mastzelldifferenzierung beteiligt wie in der Einleitung ausgeführt (siehe Kapitel 1.3). Der entscheidende Wachstumsfaktor der Mastzelldifferenzierung SCF musste als Differenzierungsfaktor außen vor bleiben, da HMC-1 5C6 Zellen zwei Punktmutationen des SCF-Rezeptors c-kit innehaben, und somit SCF-unabhängig proliferieren (Furitsu *et al.* 1993).

Tabelle 21: Humane Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade. Das Ziel einer Zytokinbehandlung wäre eine intermediäre Mastzelllinie zwischen HMC-1 5C6 und KMZ gewesen.

HMC-1 5C6 < ‚Zytokin-behandelte HMC-1 5C6‘ (angestrebt) < KMZ
---

Um eine mögliche Differenzierung zu identifizieren, wurden die drei charakteristischen Mastzellmarker c-kit, Tryptase und Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  herangezogen. c-kit ist im allgemeinen wohl einer der weniger spezifischen Rezeptoren für Mastzellen, obgleich von allen – auch unreiferen – Mastzellen exprimiert und auf fast allen pluripotenten Zellen zu finden, eine Eigenschaft, die mit fortschreitender Reifung verloren geht, nicht aber bei Melanozyten und Mastzellen (Ashman 1999); auch auf unreifen Mastzellen wie den HMC-1 5C6 Zellen sind hohe Level von c-kit nachweisbar. Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  weist die höchsten Expressionsgrade bei Mastzellen und basophilen Granulozyten auf (Hasegawa *et al.* 1999). Hinsichtlich der Mastzellen wird angenommen, dass sich die Expression mit fortschreitendem Reifegrad verstärkt. Die Tryptase ist eine klassische

Serinendoprotease der Mastzelle, wird kaum von anderen Zellen exprimiert und ist somit ein typisches wenn nicht sogar das typischste Mastzellmerkmal (Schwartz 2001).

Dies wird zusätzlich durch neue Daten der Arbeitsgruppe belegt, die zeigen, dass die Transkriptspiegel der Tryptase 20fach erhöht sind gegenüber den – ebenfalls recht weit differenzierten – LAD 2 Zellen (Babina *et al.* 2005b). Die Unterschiede auf der Proteinebene sind noch drastischer (Guhl, Babina, unveröffentlicht).

Die zwei eingesetzten Zytokine IL-4 und IL-6 und der Nervenwachstumsfaktor NGF- $\beta$  zeigten bezüglich der drei gewählten Mastzellmarker teils eben zwar messbare teils auch deutliche Effekte auf die unreife HMC-1 5C6 Zelllinie. Ein intermediär differenziertes Mastzellsystem entstand jedoch nicht, womit sich die Zelllinie unter diesen Bedingungen als weitgehend differenzierungsresistent erwies.

Während IL-6 und NGF- $\beta$  nur geringe bzw. gar keine Effekte auf HMC-1 5C6 Zellen hatten, induzierte IL-4 eine einheitliche Herunterregulation aller drei untersuchten Marker verbunden mit einer deutlich antiproliferativen Wirkung, die bereits bei der parentalen HMC-1 Zelllinie aufgefallen war (Valent *et al.* 1991). Obwohl die Effekte von IL-6 und NGF- $\beta$  nicht so sehr ins Gewicht fielen wie die von IL-4, so ist doch hervorzuheben, dass die Kombination beider zu einer Hochregulation von c-kit und Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  führte und die Effekte von IL-4 leicht dämpfte, nicht aber umkehren konnte. Alle Daten gemeinsam betrachtet legen nahe, dass die Mechanismen, denen die Expression der verschiedenen Marker unterliegt, weitgehend unabhängig voneinander operieren. So wurde von IL-6 ein Marker herunter (Tryptase), ein anderer hoch reguliert (c-kit), während die Kombination mit NGF- $\beta$  nur zu der oben besagten Hochregulation führte.

Ein weiterer Aspekt geht aus der 24tägigen Kinetikstudie mit HMC-1 5C6 Zellen hervor, bei der sich die maximalen Effekte bereits nach dreitägiger Inkubation mit den Mediatoren einstellten. Dies zeigte zum einen, dass der Weg der Signaltransduktion bis zur Wirkung an den Effektorproteinen zeitlich kürzer ist als bei vielen typischen Differenzierungsagentien, deren Anwesenheit oft mehrere Wochen über gewährleistet sein muss, um die angestrebten Effekte zu erzielen. Zum anderen geht daraus hervor, dass der Effekt keinen kumulativen Aspekt birgt und auch nach 24 Tagen nicht sehr stark an Intensität verliert. Dies wird wahrscheinlich dadurch mitbedingt, dass aufgrund der stetigen Proliferation der Zelllinie die individuelle Zelle einem wesentlich kürzeren Einfluss der Mediatoren unterliegt als aus der Kinetik ableitbar wäre. Andererseits lässt sich die kleine Abschwächung der Effekte (c-kit nach 24 Tagen, Diagramm 1) am ehesten mit einer gewissen Desensibilisierung der Zellen nach langfristiger Inkubation mit den Mediatoren erklären. Da die Kinetikstudie jedoch nur einmal durchgeführt wurde, bleiben

die Erklärungen spekulativ, und es lassen sich daraus keine allgemein gültigen Schlüsse ziehen.

Der IgE-Rezeptorteil  $Fc\epsilon RI\alpha$  war bei HMC-1 5C6 Zellen superfiziell nur sehr schwach exprimiert, während die Expression intrazellulär deutlich höher war. Erklären ließe sich dies in Anlehnung an vorangegangene Publikationen, bei denen  $Fc\epsilon RI\alpha$  intrazellulär gespeichert wurde (Hasegawa *et al.* 1999, Smith *et al.* 2000). Dies würde eine weitere Möglichkeit der Zelle darstellen, die Expression des IgE-Rezeptors und die damit verbundene IgE-Quervernetzung zu regulieren und zwar durch Präformation und zytoplasmatische Speicherung des Rezeptorkomplexes gefolgt von dessen Transport zur Plasmamembran auf einen Stimulus hin. Alternativ könnte man aber auch einen HMC-1 5C6-spezifischen Defekt im  $Fc\epsilon RI$ -Transport zur Zellmembran oder ein Fusionsproblem der  $\alpha$ -Kette mit den anderen beiden Untereinheiten annehmen. In der Tat werden die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten gar nicht oder nur geringfügig von HMC-1 5C6 Zellen exprimiert, was sich durch quantitative RT-PCR am *LightCycler* im Vergleich mit den anderen Mastzellarten demonstrieren ließ (Babina *et al.* 2005b).

Blickt man auf andere Studien zu diesem Thema, kommen weitere interessante Aspekte zum Vorschein. Bei Mastzellen, die aus Nabelschnurblut gezüchtet wurden, waren die dedifferenzierenden Effekte von IL-4 durch IL-6 aufhebbar, und IL-6 konnte seine differenzierende Wirkung auf unreife Mastzellen vor allem durch eine Hemmung der Mastzellapoptose entfalten (Oskeritzian *et al.* 1999). Tatsächlich gilt IL-6 als einer der entscheidenden Wachstumsfaktoren neben rhSCF in der *in vitro* Mastzellgenerierung (Nakahata *et al.* 1995, Kirshenbaum *et al.* 1999). Kinoshita *et al.* berichteten dagegen über eine Herunterregulation von c-kit durch IL-6 plus rhSCF versus rhSCF allein (1999); wie dies im Zusammenhang mit den anderen zitierten Studien zu bewerten ist, bleibt abzuwarten. Weitere Publikationen (Saito *et al.* 1995, Kirshenbaum *et al.* 1999, siehe auch Kapitel 1.3.2) zeigen einen stark differenzierenden und gleichzeitig antiapoptotischen Effekt von IL-6 bei sehr unreifen ‚Prä-Pro-Mastzellen‘ – Mastzellen die sicherlich unreifer als HMC-1 5C6 Zellen und gleichzeitig nicht leukämisch entartet sind. Bei HMC-1 5C6 Zellen ist, wie hier gezeigt, dieser Effekt praktisch nicht mehr nachvollziehbar obwohl sie einen IL-6-Rezeptor aufweisen (Schoeler *et al.* 2003). Gleiches gilt auch für den Nervenwachstumsfaktor NGF- $\beta$ , was außerdem den schwachen, dennoch nachweisbaren Synergismus mit IL-6 erklären könnte (Kanbe *et al.* 2000).



## 5.2 Die intermediär differenzierten LAD 2 Zellen

In der Zeit, in der diese Arbeit entstand, extrahierte die Arbeitsgruppe unter Dr. Metcalfe von einem Patienten mit Mastzellsarkom die Mastzelllinie LAD 2 (Kirshenbaum *et al.* 2003). Sie stellt im Verhältnis zu HMC-1 5C6 Zellen und KMZ ein intermediäres Reifestadium dar, das dabei näher bei der KMZ als bei der HMC-1 5C6 Zelle liegt (Tabelle 22). Damit stand der Arbeitsgruppe trotz des nicht geglückten Versuchs ein intermediäres Mastzellsystem zu generieren (vgl. 5.1), eine dritte Mastzellart zur Verfügung.

Tabelle 22: Humane Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade. Nachdem die Arbeitsgruppe unter Dr. Metcalfe die Mastzelllinie LAD 2 zur Verfügung gestellt hatte, standen dem Labor drei Mastzellmodelle zur Verfügung.

HMC-1 5C6 << LAD 2 < KMZ
--------------------------

## 5.3 IL-4 vermittelte Effekte sind abhängig vom Differenzierungsgrad

Bevor sich die Arbeit dem Hauptteil, also dem Einfluss von ATRA auf Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade, widmete, sollte zunächst untersucht werden, ob die IL-4-vermittelten Effekte auf HMC-1 5C6 Zellen auch für die beiden anderen Mastzelltypen LAD 2 Zellen und KMZ Gültigkeit besitzen, oder ob die Effekte etwa abhängig vom Reifegrad bzw. Proliferationspotential der Zellen sind. Die beiden Mastzellmarker c-kit und FcεR1α wurden betrachtet und brachten ein klares Ergebnis: Nur bei HMC-1 5C6 Zellen konnte IL-4 einen signifikanten Effekt erzielen und die beiden Marker herunterregulieren, während bei LAD 2 Zellen höchstens ein Trend, bei c-kit und bei KMZ gar kein Effekt mehr zu erkennen war. Zusätzlich zu den HMC-1 5C6 Zellen konnte auch bei den schwächer proliferierenden LAD 2 Zellen eine antiproliferative Komponente festgestellt werden, wenngleich deutlich vermindert. Dem gegenüber stehen KMZ, bei denen IL-4 das Überlebenspotential der Zellen erhöht, ein Effekt, der bereits in der Literatur beschrieben wurde (Babina *et al.* 2004).

Die Effekte von IL-4 auf humane Mastzellen waren bereits vielfach Thema in Publikationen. So beschrieben Nilsson *et al.* in zwei Publikationen einen negativen Effekt auf die Expression der Proteine c-kit und Tryptase (Nilsson *et al.* 1994b, Nilsson & Nilsson 1995). In anderen Arbeiten wurde die Expression von FcεR1α durch IL-4 hochreguliert (Toru *et al.* 1996, Xia *et al.* 1997). Setzt man die Ergebnisse der Arbeit in diesen Kontext, so scheint sich die Vermutung zu bestätigen, dass bei proliferierenden, (sehr) unreifen Mastzellen – Mastzellen, die noch nicht den Weg ins Gewebe gefunden haben – IL-4 sowohl einen dedifferenzierenden Einfluss im Sinne einer Herunterregulation einiger Mastzellmarker hat als auch die Proliferation und das

Größenwachstum bremst. Ein negativer Einfluss von IL-4 ist auch bei Monozyten gut dokumentiert (Sonoda 1994, Hart *et al.* 1999), und die ähnlichen Effekte könnten deren angenommene ontogenetische Verwandtschaft mit Mastzellen weiter untermauern (Kirshenbaum *et al.* 1999, Babina *et al.* 2004).

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit zeigen, dass der Einfluss von IL-4 auf Mastzellen nicht nur Spezies-spezifisch (Mensch vs. Nager) und abhängig vom Mastzelltyp/Lokalisation (mukosale Mastzellen vs. Bindegewebsmastzellen) ist, wie in der Literatur angedeutet, sondern, dass bei humanen Mastzellen der Reifegrad die entscheidende Rolle bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber IL-4 spielt.

In ihrer Systematik durch die parallele Einbeziehung verschiedener Mastzellarten stellt die Arbeit ein gewisses Novum dar: Es wurde demonstriert, dass die scheinbaren Widersprüchlichkeiten der Literatur hinsichtlich der Einflüsse von IL-4 auf Mastzellen in Wirklichkeit gar keine Widersprüche darstellen, sondern dass Mastzellen in jedem Fenster ihrer Entwicklung ein anderes Ansprechpotential aufweisen (Thienemann *et al.* 2004a).

#### 5.4 Der dedifferenzierende Einfluss von ATRA auf humane Mastzellen

Der Hauptteil der Arbeit beschäftigt sich mit den Effekten von ATRA auf humane Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade. ATRA ist ein wichtiger Regulator zellulärer Transkriptionsprogramme und beeinflusst ganz wesentlich die Entwicklung fötaler und embryonaler Zellen (Kastner *et al.* 1995). Zudem nimmt der Einfluss von ATRA nach der Geburt nicht ab und moduliert weiterhin viele Prozesse. Dabei wirkt ATRA besonders potent auf solche Zellen des adulten Organismus, die weiterhin ein proliferatives Potential aufweisen und regeneriert werden. Dies gilt besonders für Zellen der Hämatopoese und ephithelialen Entwicklung.

Blickt man auf die Hämatopoese, so sind die Effekte vielseitig und erscheinen häufig kontrovers. So kann ATRA je nach Zelltyp und Reifegrad die Differenzierung fördern oder hemmen, die Zellzahlentwicklung positiv wie negativ beeinflussen und Zellfunktionen aktivieren oder eliminieren. Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt sind die Regulationsprozesse in der myeloischen Reihe abhängig vom Typ und Differenzierungsgrad der einzelnen Zellen. Humane Mastzellen als hämatopoetisch-myeloische Zellen sind ebenso wie Granulozyten und Monozyten offenbar Ziel des Retinoids. Bislang gibt es aber nur einige wenige Arbeitsgruppen, die sich mit Retinoiden und deren Effekte auf Mastzellen befasst haben. Im Konsens sind die Effekte von ATRA auf Mastzellen bislang ein negativer Einfluss auf die Entwicklung der Zellzahl und auf die Differenzierung im Sinne einer verminderten Expression spezifischer Oberflächenmoleküle, Mastzellproteasen sowie von Histamin. Die Expression anderer pan-leukozytärer Moleküle wie der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-3 sowie von CD43 wurde hingegen verstärkt (Babina *et al.* 1997a, 1997b, 2001). Die bislang vorliegenden Daten beziehen sich dabei fast ausschließlich auf proliferative Systeme. Um weitere Einblicke in die Wirkungsweise von ATRA auf Mastzellen zu gewinnen und zu klären, ob die Effekte des Retinoids sich in Abhängigkeit des Reifegrades bzw. der Teilungsfähigkeit von Mastzellen unterscheiden, wurden drei Mastzellsysteme mit ATRA behandelt.

Die Untersuchungen zeigten einen direkten ATRA-Einfluss auf HMC-1 5C6, LAD 2 und KMZ in Form einer Herunterregulation all jener Mastzellmarker, die Gegenstand der Untersuchung waren (ausgenommen HDC). Daher lässt sich feststellen, dass humane Mastzellen in Anwesenheit des Retinoids offenbar dedifferenzieren. Zudem scheint, dass Mastzellen während ihrer gesamten Lebensdauer effektives Ziel des Retinoids sind, da der Effekt unabhängig von ihrem Reifestadium und bei allen drei untersuchten Mastzellsystemen nachweisbar war. So reduzierte in allen drei Mastzellarten ATRA die Expression von c-kit, Tryptase, FcεRIα und FcεRIγ. Die andere Serinendoprotease Chymase – auf Proteinebene nur in KMZ, auf mRNA-Ebene bei LAD 2 und KMZ nachweisbar – wurde ebenfalls herunterreguliert, während FcεRIβ durch ATRA nur in KMZ negativ beeinflusst wurde, nicht aber bei LAD 2 Zellen. FcεRIβ war bei

HMC-1 5C6 Zellen nicht detektierbar. Das Enzym HDC war der einzige Mastzellmarker, der nicht die geringste Beeinflussbarkeit durch ATRA aufwies. Es ist beachtenswert, dass keiner der untersuchten Mastzellmarker hochreguliert wurde.

Auf den ersten Blick waren die Effekte von ATRA unabhängig vom Reifegrad des untersuchten Mastzelltyps. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Ergebnisse fällt jedoch eine Tendenz der Zunahme des Effekts von ATRA mit zunehmendem Reifegrad auf. So ist auf Proteinebene bei c-kit, Trypase und FcεRIα die Herunterregulation der Expression bei KMZ stärker ausgeprägt als bei LAD 2 Zellen und am schwächsten bei HMC-1 5C6 Zellen. Die Chymase ist bei LAD 2 und HMC-1 5C6 Zellen in der Durchflusszytometrie nicht nachweisbar und somit kein Trend beschreibbar. Auch der ATRA-Einfluss auf die mRNA-Konzentration von c-kit, Tryptase, Chymase, FcεRIα und FCεRIβ ist bei KMZ stärker als bei den beiden unreiferen Mastzelltypen HMC-1 5C6 und LAD 2. Allerdings war bei HMC-1 5C6 Zellen die Chymase-spezifische mRNA nicht detektierbar. Zielzellen des Retinoids sind im allgemeinen weniger differenzierte Zellen vor allem in der Embryogenese und frühen Hämatopoese (Gudas *et al.* 1994). Bei Mastzellen scheint dies nicht der Fall zu sein, da differenzierte KMZ die stärksten Effekte nach ATRA-Behandlung aufwiesen und somit auch in diesem Reifestadium ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Retinoid beibehielten – ein interessanter Gesichtspunkt im Kontext der Wirkungsweise von Vitamin A und seinen Derivaten.

Es lässt sich daher vermuten, dass die Einflüsse von ATRA auf Mastzellen über Mechanismen operieren, die in ähnlicher Weise in jedem Mastzelltyp und unabhängig vom Reifegrad induzierbar sind.

HMC-1 5C6 und LAD 2 Zellen proliferieren *in vitro* praktisch unendlich (allerdings mit sehr unterschiedlichen Raten) – HMC-1 5C6 sogar unabhängig von rhSCF. KMZ besitzen keine mitotische Aktivität. ATRA hat einen stark antiproliferativen Effekt u.a. auf leukämische Zellen *in vitro* (Breitman *et al.* 1980, Benthin *et al.* 2001), auf Tumorzellen *in vivo* wie bei der APL (Chomienne *et al.* 1996) und auf myeloische Vorläuferzellen (Douer *et al.* 2000). Auch bei HMC-1 Zellen verursacht ATRA eine Reduktion der Zellzahl (Nilsson *et al.* 1994a, Alexandrakis *et al.* 2003). Zelluläre Differenzierung geht regelmäßig mit einem Stillstand mitotischer Aktivität einher (Breitman *et al.* 1980, Olsson & Breitman 1982, Matikainen & Hurme 1994, James *et al.* 1997, Kreutz *et al.* 1998, Babina & Henz 2003). Dies macht man sich in der Therapie der APL mit ATRA zunutze, wobei eine Differenzierung der unreifen Blasten in Richtung Granulozyten erreicht wird (Chomienne *et al.* 1996). Die Mechanismen könnten dabei über eine rein RARE-vermittelte Gentranskription hinausgehen, da sich feststellen ließ, dass auch andere Signalwege, die über STAT-Proteine, Tyrosinkinase und MAPKs (siehe Kapitel 1.2.2) verlaufen, ebenfalls durch ATRA rekrutiert werden, wobei noch nicht klar ist, was dies beispielsweise für die Therapie der APL bedeutet (Kambhampati *et al.* 2004). Setzt man nun die

Ergebnisse der Effekte von ATRA auf die Proliferation von HMC-1 5C6 und LAD 2 Zellen dieser Arbeit in wissenschaftlichen Kontext, so bestätigt sich zwar die antiproliferative Eigenschaft von ATRA (Tabelle 9), die interessanterweise jedoch nicht, wie für andere Zellarten beschrieben, mit einer Differenzierung sondern einer Dedifferenzierung der Zelllinien einherging. Zusätzlich konnte mit der YO-PRO-1-Methode gezeigt werden, dass ATRA keinerlei Zelltod-induzierenden Effekt besitzt, und die Reduktion der Zellzahl proliferierender HMC-1 5C6 Zellen und LAD 2 Zellen daher auf antiproliferativen Eigenschaften von ATRA, nicht aber auf einer beschleunigten Sterberate beruht. Dies steht im Einklang mit der zahlreichen hierzu vorliegenden Literatur (Alexandrakis *et al.* 2003, Otsuki *et al.* 2003).

Es kann also vermutet werden, dass der antiproliferative Effekt von ATRA auf beide Zelllinien von den ansonsten dedifferenzierenden Effekten unabhängig und ihnen schlichtweg übergestülpt ist. Dass diese beiden Prozesse – d. h. Antiproliferation und Dedifferenzierung – zeitgleich auftreten können, lässt sich versuchsweise damit erklären, dass die typisch antiproliferative Wirkung von ATRA, die in fast allen Zellsystemen beobachtet wird, auch bei den Mastzelllinien auftritt, hier aber gekoppelt ist mit Negativeinflüssen auf typische Linienmarker. Letztere scheinen wiederum während der gesamten Lebensdauer einer Mastzelle zu bestehen, wenn man die vorliegende Literatur (Kinoshita *et al.* 2000, Alexandrakis *et al.* 2003, Hjertson *et al.* 2003) mit den Daten der eigenen Studie kombiniert. Der mechanistische Unterbau, der den antiproliferativen Effekten von ATRA bei einigen leukämischen Zellen zugrunde liegt, besteht in einer starken Abnahme der c-Myc und Cyclin-E-Konzentration, gefolgt von einer posttranskriptionellen Hochregulation der Expression der Proteine p21<sup>WAF1/CIP1</sup> und p<sup>27Kip1</sup>, wodurch der Eingriff in die Zellzyklusprogression bewerkstelligt wird (Dimberg *et al.* 2002). Cycline modulieren den Eintritt einer Zelle in die Mitose, indem sie andere Enzyme (Cyclin-abhängige Kinasen) anschalten und so den Übergang von der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase und dann weiter in die S-Phase bewirken (Berg *et al.* 2002). Es kann vermutet werden, dass ähnliche Mechanismen auch bei HMC-1 5C6 und möglicherweise auch bei LAD 2 Zellen greifen. Das Konzept der höchsten ATRA-Effekte bei proliferativen Stadien einer Zellart kann in Bezug auf ATRA und humane Mastzellen nicht aufrechterhalten werden, da die Dedifferenzierung mit zunehmendem Reifegrad der Mastzellen quantitativ zunahm und bei KMZ am höchsten war. Auch wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit von KMZ durch ATRA nicht beeinflusst (Tabelle 9). Diese Ergebnisse spiegeln die anderer Untersuchungen wider (Hjertson *et al.* 2003). In Bezug auf Mastzellen und ATRA müssen Differenzierung und Proliferation in Zukunft gesondert betrachtet werden.

Im Unterschied zu den eigenen Daten beschrieben Kinoshita *et al.* unter Verwendung von aus Nabelschnurblut gezüchteten Mastzellen eine starke Abnahme von Histamin durch Retinoide (2000). Dabei wurde die HDC-Expression nicht untersucht. Da es in dieser Studie zu einer

massiven Abnahme der Zellgröße durch ATRA kam, sagt die Zunahme von Histamin auf einer Pro-Zell-Basis wenig darüber aus, ob die Histaminkonzentration in der Zelle – bezogen auf die Zellmasse bzw. auf andere als konstant angenommene Referenzproteine – tatsächlich ansteigt. Desweiteren berichteten Hjertson *et al.*, dass in der Retinoid-behandelten Haut keine Effekte auf die Mastzelldichte erkennbar sind (2003). Während die nur Tryptase-positiven Mastzellen geringfügig anstiegen, ließ sich keinerlei Einfluss auf die typischen Tryptase<sup>+</sup>/Chymase<sup>+</sup> doppelt positiven Mastzellen feststellen. Obgleich die Gruppe diese Befunde dahingehend interpretiert hat, dass Retinoide lediglich auf Mastzellvorläufer wirken und reife Mastzellen weniger suszeptibel sind, lassen sich die Befunde durchaus in Einklang mit der eigenen Studie bringen und dabei alternativ interpretieren: Abgesehen davon, dass die Effekte auf Mastzellen in komplexen *in vivo* Situationen durch die Effekte weiterer Zellen indirekt moduliert werden können, findet auch die vorliegende Arbeit keinen Einfluss von ATRA auf das Überleben der KMZ. Desweiteren ist die hier aufgedeckte Herunterregulation von Tryptase und Chymase auf Proteinebene relativ gering, viel zu gering jedenfalls, um mittels Immunhistochemie, die allenfalls semi-quantitative Aussagen gestattet, detektierbar zu sein. Die hier vorgenommenen Studien zur Quantifizierung der mRNA-Ebene, die eine deutliche Abnahme beider Proteasen demonstriert haben, sind von Hjertson *et al.* dagegen nicht durchgeführt worden.

Mastzellen verfügen über diverse Retinoidrezeptoren (Babina *et al.* 2001 und weitere unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe) und sind daher zu einem RAR- und/oder RXR-vermittelten Einfluss auf die Genexpression in der Lage. Wie jedoch dieser erste Schritt, d.h. die Bindung von ATRA an Retinoidrezeptoren und deren Aktivierung, in die komplexe Erscheinung der Dedifferenzierung übersetzt wird, ist unklar. Aufgrund der relativ langen Zeiten, die nötig sind, um die Effekte zu beobachten, kann jedoch angenommen werden, dass es sich in den meisten Fällen um indirekte Einflüsse handelt. Das heißt, dass ATRA nicht direkt in die Regulation der Mastzellmarker eingreift (ohnehin eher unwahrscheinlich, weil RAREs i.d.R. positiv-regulatorische Elemente sind, die die Transkriptionsrate eines Gens verstärken und nicht abschwächen [Chambon 1996]), sondern die Produktion weiterer regulatorischer Proteine steuert, die anschließend (ggf. über weitere Zwischenstufen) die Linienmarker herabregulieren. In der Tat liegen der Arbeitsgruppe bereits Ergebnisse vor, die aufzeigen, dass ATRA massiv in das Transkriptionsfaktor-Repertoire von Mastzellen eingreift (Babina, bislang unveröffentlichte Daten). Die detaillierte Aufklärung aller molekularen Mechanismen wird allerdings noch große Forschungsanstrengungen erfordern und könnte viele Jahre dauern.

Wie bereits beschrieben wird die Mehrheit der Mastzellmarker sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene herunterreguliert. Die Wege, die zu dieser veränderten Expression führen, sind aber vermutlich je nach Marker unterschiedlich. Ein Hinweis darauf ist die mal stärkere Herunterregulation auf Proteinebene (Diagramm 4) und mal auf mRNA-Ebene (Diagramm 5).

Zwei Extreme sind der SCF-Rezeptor c-kit, der auf Proteinebene durch ATRA sehr stark herunterreguliert wurde, während die mRNA-Konzentration schwächer oder gar nicht betroffen war. Das andere Extrem ist die Chymase. Bei dieser war die mRNA-Konzentration am stärksten negativ beeinträchtigt. Die Unterschiede zwischen Protein- und mRNA-Expression könnten unter anderem auch von der Proteinstabilität abhängen. Während die Trypsinase und Chymase in Granula gespeicherte Proteasen sind – bei beiden ist die mRNA deutlich herunterreguliert –, sind c-kit und FcεRIα in die Zellmembran integriert und unterliegen gegebenenfalls anderen Auf- und Abbaumechanismen.

Die höhere Stabilität der Serinendoproteasen könnte z. B. durch den protektiven Einfluss von Proteoglykanen gewährleistet sein (Humphries *et al.* 1999). Eine sehr hohe Stabilität der Proteasen in ihrer natürlichen Umgebung kann daher angenommen werden. Als alternative, wenngleich weniger wahrscheinliche Erklärung, kommt auch in Betracht, dass die die Proteasen kodierende mRNA keinen limitierenden Faktor bei der Determination der Proteinmenge darstellt.

Während sich die Ergebnisse der Proteasen probeweise erklären lassen, war zunächst völlig unklar, welchen Weg die ATRA-vermittelte Herunterregulation von c-kit beschreitet, ohne dass seine mRNA in den HMC-1 5C6 Zellen einem Einfluss unterliegt. Es muss daher weitere Mechanismen geben, die die Zelloberflächendichte von c-kit beeinflussen. Gut dokumentiert sind z. B. die Liganden-(d. h. SCF-)vermittelte Internalisierung mit anschließender Degradation sowie eine proteolytische Abspaltung nach Zellaktivierung (*shedding*), so dass der c-kit Metabolismus nicht mit einer veränderten Genaktivität einhergehen muss (Brizzi *et al.* 1993, Yee *et al.* 1993, Shimizu *et al.* 1996, Cruz *et al.* 2004).

In den hier durchgeführten Studien ließ sich tatsächlich zeigen, dass ATRA die c-kit-Expression auf zweifache Weise beeinflusst: Zum einen über einen transkriptionellen Mechanismus, der besonders stark bei den KMZ gefolgt von LAD 2 Zellen auftritt, zum anderen durch einen posttranskriptionellen Weg, der bei HMC-1 5C6 Zellen besonders ausgeprägt ist. In der Tat geht die gesamte Abnahme von c-kit bei letzteren offenbar auf diesen zweiten regulatorischen Mechanismus zurück, denn die Transkriptkonzentration ist zu keinem Zeitpunkt signifikant betroffen. Es deutet sich dabei an, dass der Einfluss von ATRA auf translationellem Weg erfolgen könnte. Dies wird einerseits durch die kinetischen Daten gestützt: Der Effekt ist bereits nach 16 h maximal (Diagramm 6), d.h. nach einem wesentlich längeren Zeitraum als z. B. die Liganden-induzierte c-kit-Internalisierung, die bereits nach 20 min erkennbar ist, aber doch nach einem kürzeren Zeitabschnitt, den in der Regel eine transkriptionelle Regulation erfordert, um ihr Maximum zu erreichen. Andererseits wird aus den Kombinationbehandlungen mit ATRA + Inhibitoren (versus Inhibitoren alleine) deutlich, dass der Effekt von ATRA bei Anwesenheit von Cycloheximid verschwindet, nicht aber bei Anwesenheit anderer Inhibitoren (Diagramm 7). Dies deutet darauf hin, dass Cycloheximid und ATRA gleichartig operieren. Ein translationeller

Mechanismus ist in der Literatur bislang im Zusammenhang mit der c-kit-Regulation noch nicht beschrieben worden, seine Existenz wäre jedoch von hohem Interesse. Deswegen werden die Studien, die endgültig zu seiner Identifizierung führen sollen, in dem Labor intensiv weitergeführt.

Im Zusammenhang mit der Regulation von c-kit ist erwähnenswert, dass die hier gefundene starke Abnahme der Proteinexpression auf Mastzellen beschränkt zu sein scheint, da sie bei c-kit<sup>+</sup>-Stammzellen nicht auftritt (Hayashi *et al.* 1995, Herault *et al.* 1998).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ATRA einen deutlich dedifferenzierenden Einfluss auf Mastzellen ausübt (Abbildung 17), der durch die Herunterregulation aller untersuchten Mastzellmarker (mit Ausnahme von HDC) veranschaulicht wird, und dass diese Effekte bei allen drei Mastzelltypen detektierbar sind. Es gibt nur wenige Studien, die ATRA mit Negativeffekten auf Linienmarker in Zusammenhang bringen, am ehesten wohl noch bei Mastzellen. Dies hatte sich in der Literatur bereits angedeutet, konnte aber in dieser Arbeit nunmehr – auch unter Zuhilfenahme terminal differenzierter Mastzellen – endgültig demonstriert werden. ATRA bestätigt sich daher abermals als ein wichtiger Akteur der Hämatopoese im allgemeinen und der Myelopoese im besonderen (Abbildung 3 und Abbildung 17). In dem komplexen Zusammenspiel von Wachstum und Entwicklung koordinieren ATRA und andere Retinoide nicht nur einen einzigen Mechanismus wie beispielsweise die Differenzierung oder Dedifferenzierung einer einzelnen Zellart. Sie koordinieren auch im eigentlichen Sinne des Wortes viele Prozesse gleichzeitig und beeinflussen dabei vermutlich Aspekte wie beispielsweise Alter, Gesundheitszustand oder Homöostase unter Berücksichtigung der jeweiligen Erfordernisse und entsprechender Anpassung ihrer Wirkung. So kann es sein, dass ATRA bei dem einen Zelltyp differenzierende Eigenschaften aufweist, während der andere Zelltyp zur Dedifferenzierung gebracht wird. Der dedifferenzierende Einfluss von ATRA auf Mastzellen ist hiermit systematisch aufgearbeitet worden und ermöglicht eine neue Betrachtungsweise von ATRA in Bezug auf Wachstum und Differenzierung von Leukozyten.



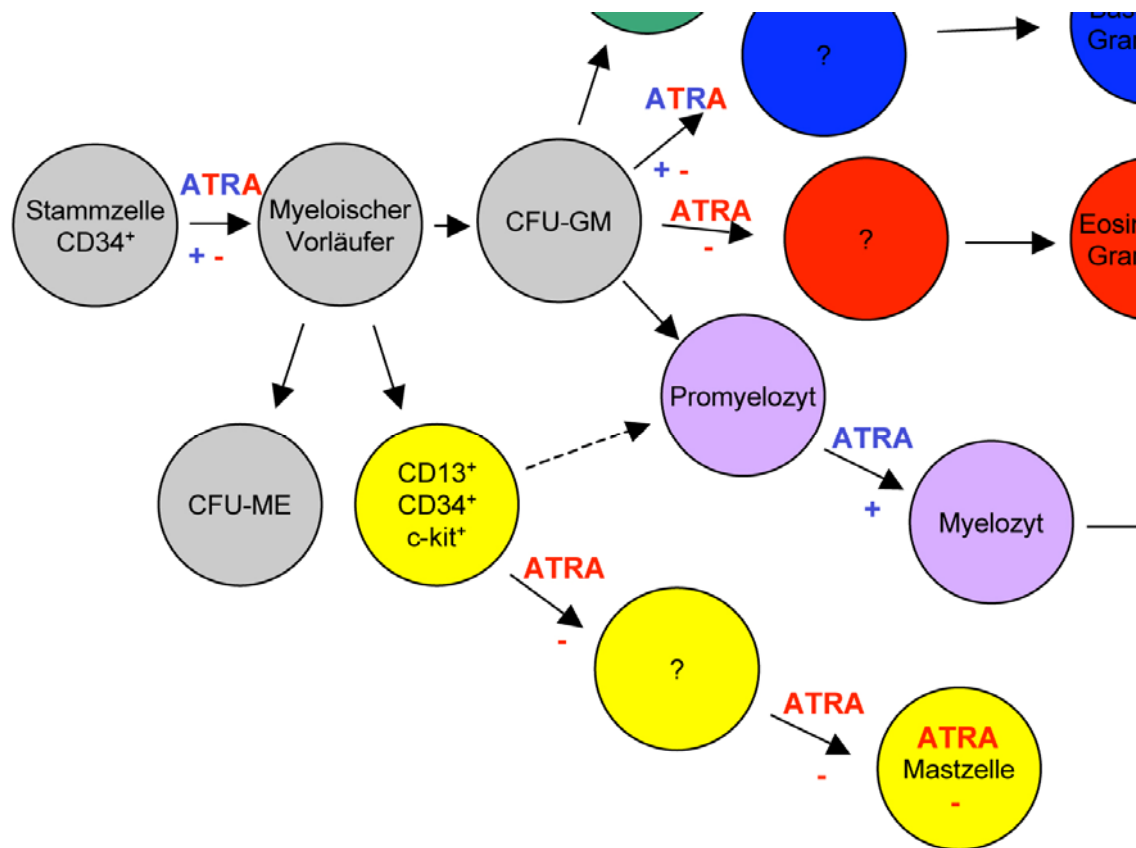


Abbildung 17: Ausschnitt von dem Modell der Myelopoese aus der Einleitung (Abbildung 3). Die Grafik ist um die neuen Erkenntnisse aus dieser Arbeit probeweise erweitert und der dedifferenzierende Einfluss von ATRA auf humane Mastzellen in Rot ergänzt worden.

## 5.5 Gegenüberstellung der Einflüsse von IL-4 und ATRA auf Mastzellen

Nachdem der Versuch gescheitert war, ein reiferes Zellsystem als die HMC-1 5C6 Zellen mit Hilfe der ausgewählten Zytokine zu generieren, wurde dennoch weiter in die deutlich negativen Effekte von IL-4 auf Mastzellen investiert. Wie bei den Versuchen mit ATRA wurden auch die Effekte von IL-4 auf alle drei Mastzellsysteme im Vergleich getestet. Der Grund dafür war, dass zwar bereits viele Publikationen zum IL-4-Effekt auf Mastzellen verfügbar waren, die Daten aber deutlich divergierten. Somit sind die Mastzellsysteme HMC-1 5C6, LAD 2 und KMZ sowohl mit IL-4 als auch mit ATRA behandelt worden.

Im Gegensatz zu IL-4 waren die Effekte von ATRA auf Mastzellen weitgehend unabhängig vom Reifegrad, die Qualität der Effekte bei allen untersuchten Mastzelltypen ähnlich. Damit präsentiert sich IL-4 als ein Zytokin, das nur in einem sehr kurzen Zeitfenster auf Mastzellen zu wirken scheint, da selbst bei den intermediär differenzierten LAD 2 Zellen nur noch ein Trend aber kein signifikanter Effekt auf die c-kit- und FcεRIα-Expression nachweisbar war. Dies liegt nicht an einer abnehmenden Expression des IL-4-Rezeptors (Babina, Guhl, unveröffentlicht) oder des in die Signaltransduktion involvierten STAT6 (Babina *et al.* 2005a) in den verschiedenen Mastzellen. Es gibt also Substanzen, die Mastzellen während ihrer gesamten Genese ansprechen können, wohingegen die Wirkung anderer auf ein spezielles Stadium beschränkt bleibt oder gar revertiert werden kann.

Interessant ist dieser Gesichtspunkt natürlich im Hinblick auf die Mastzellheterogenität und bietet eine Erklärung für die großen Unterschiede und starke Schwankungsbreite in den publizierten Untersuchungen zu Mastzellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, wie wichtig bei der konsequenten Untersuchung von Mastzellen der parallele Einsatz verschiedener Mastzellsysteme ist, um Veränderungen von Prozessen wie der Ansprechbarkeit gegenüber Mediatoren zu erfassen, um allgemein gültige und nicht auf eine einzige Zelllinie beschränkte Erkenntnisse zu erzielen. Erst dann lassen sich klare Schlussfolgerungen ziehen. Die Bedeutung eines Metaboliten, der nur in einem sehr kurzen Zeitfenster seine Wirkung zeigt, ist nichtsdestotrotz genauso wichtig wie die eines Metaboliten, der unabhängig vom Reifegrad auf eine Zellart lebenslang seine Wirkung entfalten kann. Im Falle des Retinoids ist der vom Reifegrad unabhängige Einfluss von wesentlicher physiologischer Bedeutung und Interesse, da sich endgültig differenzierte Zellen im humanen System im Regelfall wenig oder gar nicht durch ATRA beeinflussen lassen.

## Synopsis

Mastzellen reifen zu terminal differenzierten Zellen erst in peripheren Geweben. Bei anderen Zellen der myeloischen Reihe ist dieser Schritt zur differenzierten Zelle bereits im Knochenmark vollzogen. Bei Differenzierungsprozessen ist eine Vielzahl von Mediatoren beteiligt. In dieser Arbeit wurde erstens der Einfluss der Zytokine IL-4 und IL-6 sowie des Nervenwachstumsfaktors NGF- $\beta$  auf humane Mastzellen getestet, zweitens der Einfluss von *all-trans*-Retinsäure (ATRA) auf Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade untersucht.

### 1. Einfluss der Zytokine IL-4 und IL-6 und des Nervenwachstumsfaktors NGF- $\beta$ auf humane Mastzellen

Um ein stärker differenziertes System für die ATRA Studien zu erschaffen, wurden die HMC-1 5C6 Zellen mit den Mediatoren IL-4, IL-6 und NGF- $\beta$ , allein oder in Kombination, behandelt und die Effekte auf die typischen Linienmarker c-kit, Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  und Tryptase mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. IL-4, allein oder in Kombination, war dabei in der Lage, die Expression aller drei Mastzellmarker herunterzuregulieren und die Zellproliferation negativ zu beeinflussen, ein Effekt, der durch die Kombination mit IL-6 und/oder NGF- $\beta$  nicht aufgehoben, höchstens leicht abgeschwächt wurde. IL-6 und/oder NGF- $\beta$  hingegen wiesen kaum (IL-6) oder gar keine Effekte (NGF- $\beta$ ) auf. Ein stärker differenziertes System konnte mit all diesen Verfahren demnach nicht generiert werden. Im zweiten Schritt wurde der Einfluss von IL-4 auf Mastzellen genauer betrachtet und untersucht, ob dessen Effekte abhängig vom Reifegrad der Mastzelle sind. Hierzu wurden HMC-1 5C6 Zellen, stärker differenzierte LAD 2 Zellen und vollständig ausgereifte kutane Mastzellen (KMZ) mit IL-4 behandelt. Ein deutlicher Einfluss auf die Marker c-kit und Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  war nur bei HMC-1 5C6 Zellen zu messen, während bei LAD 2 Zellen allenfalls eine Tendenz erkennbar war und bei KMZ die Effekte gänzlich ausblieben. Der Einfluss auf die Entwicklung der Zellzahlen waren hingegen invers: Während bei HMC-1 5C6 Zellen die Proliferation negativ beeinflusst wurde, konnte bei KMZ die Überlebensrate (KMZ proliferieren nicht) signifikant verlängert werden.

**Synopsis 1:** In der Mastzellreihe besitzt IL-4 einen Negativeinfluss einzig auf unreife Zellen, während bei differenzierten Gewebemastzellen diese Effekte nicht nachweisbar sind. Damit ist der Einfluss von IL-4 auf Mastzellen von deren Differenzierungsgrad bzw. Proliferationspotential abhängig.

## 2. Einfluss von ATRA auf die Expression von Differenzierungsmarkern bei humanen Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade

ATRA ist ein wesentlicher Regulator von hämatopoetischen Zellen und kann auf positive wie auf negative Weise deren Differenzierung beeinflussen. Gegensätzliche Effekte sind teilweise sogar in ein und demselben Zelltyp beschrieben und vermutlich Ausdruck einer veränderten Ansprechbarkeit der Zellen mit zunehmender Differenzierung. Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigte sich daher mit der Frage, ob die Effekte von ATRA auf Mastzellen ebenfalls abhängig von deren Reifegrad sind. HMC-1 5C6, LAD 2 und KMZ wurden jeweils mit ATRA (3-7 Tage) behandelt und die Effekte auf die Mastzellmarker c-kit, FcεRI, Tryptase, Chymase und Histidindecaboxylase (HDC) auf Protein- und mRNA-Ebene (Durchflusszytometrie bzw. RT-PCR) untersucht. Die Proteinexpression von c-kit, FcεRI, Tryptase und Chymase wurde bei allen drei Zellsystemen herunterreguliert. Änderungen der Proteinexpression wurden qualitativ, wenngleich nicht immer quantitativ auf mRNA-Ebene reflektiert, d.h. es gab Marker, bei denen die Regulation auf der einen oder anderen Ebene überwog. Eine genaue Quantifizierung der ATRA-Effekte auf die Tryptase und Chymase zeigte eine prozentual erheblich stärkere Herunterregulation auf mRNA- als auf Proteinebene. Invers dazu war der Effekt bei c-kit, ein Effekt, der besonders deutlich bei HMC-1 5C6 Zellen auszumachen war. Zur Klärung, welcher Mechanismus der von der mRNA-Ebene unabhängigen Herunterregulation des c-kit-Proteins zugrunde liegt, wurden HMC-1 5C6 Zellen zusätzlich zu ATRA mit Inhibitoren fundamentaler Zellfunktionen inkubiert. Cycloheximid allein war dabei in der Lage, die Wirkung von ATRA zu imitieren. Es kann also vermutet werden, dass die starke Herunterregulation des Proteins im Vergleich zur mRNA einem translationellen Mechanismus folgt. Betrachtet man alle Effekte gemeinsam, zeigte ATRA den stärksten Einfluss auf das am weitesten differenzierte Mastzellsystem, nämlich KMZ. Geringer waren die Effekte bei den intermediär differenzierten LAD 2 Zellen, wohingegen bei HMC-1 5C6 Zellen das schwächste Ansprechpotential gegenüber ATRA gefunden wurde. Dies ist von besonderem Interesse, weil ATRA normalerweise wesentlich potenter auf unreif-proliferierende Systeme wirkt.

**Synopsis 2:** ATRA hat auf humane Mastzellen einen deutlichen Effekt, der in Richtung einer Dedifferenzierung weist und weitgehend unabhängig vom Reifegrad der Zellen operiert. Die Effekte scheinen dabei in Abhängigkeit vom betrachteten Marker nicht auf die transkriptionelle Ebene beschränkt zu sein, sondern könnten wie im Falle von c-kit auch einem translationellen Mechanismus unterliegen.

## Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Abkürzung
abs.	absolut
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (Angiotensin Converting Enzyme)
AML	Akute Myeloische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
APL	Akute Promyeloische Leukämie
ATRA	All-trans Retinsäure (All-Trans Retinoic Acid)
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
c-kit	SCF-Rezeptor
CML	Chronische Myeloische Leukemie
CTMC	Bindegewebsmastzelle (Connective Tissue Mast Cell)
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonkensäure (Deoxyribonucleic Acid)
Dnase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
et al	et alteri
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (Fluorescence Activated Cell Sorter)
Fc	Fc-Fragment eines Antikörpers
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzlicht
FS	Vorwärtsstreuung (Forward Scatter)
H	Histaminrezeptor
HCD	Histidindecaboxylase
HMC-1	Humane Mastzelllinie-1 (Human Mast Cell Line-1)
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (Intercellular Adhesion Molecule)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen(paare)

KMZ	kutane Mastzelle
KO	knock out
LAD 2	LAD 2 Zelle
M	Molar
MC	Mastzelle (Mast Cell)
MCF	Mittelwert der Kanalfluoreszenz (Mean Channel Fluorescence)
MMC	mukosale Mastzellen (Mucosal Mast Cell)
mRNA	messenger-RNA
n	Anzahl der Messungen
NGF	Nervenwachstumsfaktor (Nerve Growth Factor)
p	Signifikanztest
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
RAR	Retinsäure-A-Rezeptor
RARE	Retinsäure-A RE
RE	Responsives Element
rhSCF	rekombinantes humanes SCF
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
Rnase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR (Reverse Transcription-PCR)
RXR	Retinoid-X-Rezeptoren
RXRE	Retinoid-X-Rezeptore RE
SCF	Stammzellfaktor (Stem Cell Faktor)
SD	Standardabweichung (Standarddeviation)
SS	Seitwärtsstreulicht (Side Scatter)
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TH	T-Helferzellen
U	Unit(s)
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
W/Wv	white spotting
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Literaturverzeichnis

- Agis H, Füreder W, Bankl HC, et al. Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology* 1996;87:535-43.
- Akin C & Metcalfe DD. The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:13-9.
- Alexandrakis MG, Kyriakou DS, Seretakis D, et al. Inhibitory effect of retinoic acid on proliferation, maturation and tryptase level in human leukemic mast cells (HMC-1). *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003;16:43-47.
- Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1037-51.
- Babina M, Guhl S, Stärke A, Kirchhof L, Zuberbier T & Henz BM. Comparative cytokine profile of human skin mast cells from two compartments - strong resemblance with monocytes at baseline, but induction of IL-5 by IL-4 priming. *J Leukoc Biol* 2004;75:244-52.
- Babina M & Henz BM. All-trans retinoic acid down-regulates expression and function of  $\beta$ 2 integrins by human monocytes: opposite effects on monocytic cell lines. *Eur J Immunol* 2003;33:616-25.
- Babina M, Mammeri K & Henz BM. Retinoic acid up-regulates myeloid ICAM-3 expression and function in a cell-specific fashion – evidence for retinoid signaling pathways in the mast cell lineage. *J Leukoc Biol* 2001;69:361-72.
- Babina M, Schulke Y, Kirchhof L, et al. The transcription factor profile of human mast cells in comparison with monocytes and granulocytes. *Cell Mol Life Sci* 2005a;62:214-26.
- Babina M, Thienemann F, Guhl S, et al. All-trans retinoic Acid is dedifferentiating to human maszcells. *Brit J Haemtol* 2005b. *Zur Publikation eingereicht.*
- Babina M, Weber S & Henz BM. CD43 (leukosialin, sialophorin) expression is differentially regulated by retinoic acids. *Eur J Immunol* 1997a;27:1147-51.
- Babina M, Weber S & Henz BM. Retinoic acids and dexamethasone alter cell-surface density of  $\beta$ 2-integrins and ICAM-1 on human leukemic (HMC-1) mast cells. *Arch Dermatol Res* 1997b;289:111-15.
- Balmer JE & Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 2002;43:1773-808.
- Barnes JA, Singh S & Gomes AV. Protease activated receptors in cardiovascular function and disease. *Mol Cell Biochem* 2004;263:227-39.

- Beil WJ, Schulz M & Wefelmeyer U. Mast cell granule composition and tissue location--a close correlation. *Histol Histopathol* 2000;*15*:937-46.
- Benthin M, Dallmann I & Atzpodien J. 13cis- and all-trans retinoic acid have antiproliferative effects on CML cells and render IFN alpha antiproliferative potency after combined treatment in vitro. *Cancer Biother Radiopharm* 2001;*16*:323-31.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, eds. *Biochemistry*. 5th ed. International Version. New York, USA: Freeman W, 2002.
- Besmer P, Murphy JE, George PC, et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 1986;*320*:415-21.
- Bhattacharyya SN, Manna B, Ashbaugh P, Coutinho R & Kaufman B. Differentiation of respiratory epithelium: the effects of retinoic acid and carcinogens on the expression of mucociliary vs. squamous phenotype. *Inflammation* 1997;*21*:133-43.
- Bischoff SC, Sellge G, Lorentz A, Sebald W, Raab R & Manns MP. IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;*96*:8080-85.
- Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H & Kinet JP. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 1989;*337*:187-9.
- Breitman TR, Collins SJ & Keene BR. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood* 1981;*57*:1000-4.
- Breitman TR, Selonick, SE & Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;*77*:2936-40.
- Brizzi MF, Pavan M, Zini MG, Avanzi GC & Pegoraro L. Regulation of c-kit expression in human myeloid cells. *Stem Cells* 1993;*11*:42-48.
- Butterfield JH, Weiler D, Dewald G & Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res* 1988;*12*:345-55.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996;*10*:940-54.
- Chatila TA. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. *Trends Mol Med* 2004;*10*:493-9.
- Chomienne C, Fenaux P & Degos L. Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J* 1996;*10*:1025-30.
- Church MK & Clough GF. Human skin mast cells: in vitro and in vivo studies. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;*83*:471-5.



- Coelho AM, Ossovskaya V & Bunnett NW. Proteinase-activated receptor-2: physiological and pathophysiological roles. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2003;1:61-72.
- Collins SJ. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia* 2002;16:1896-905.
- Costa JJ, Demetri GD, Harrist TJ, et al. Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. *J Exp Med* 1996;183:2681-6.
- Cruz AC, Frank BT, Edwards ST, Dazin PF, Peschon JJ & Fang KC. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme controls surface expression of c-Kit and survival of embryonic stem cell-derived mast cells. *J Biol Chem* 2004;279:5612-20.
- Czarnetzki BM, Grabbe J, Kolde G, Kruger-Krasagakes S, Welker P & Zuberbier T. Mast cells in the cytokine network: the what, where from and what for. *Exp Dermatol* 1995;4:221-6.
- Dawson MI. Synthetic retinoids and their nuclear receptors. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2004;4:199-230.
- De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* 1991;5:2924-33.
- Dimberg A, Bahram F, Karlberg I, Larsson LG, Nilsson K & Oberg F. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines is associated with sequential down-regulation of c-Myc and cyclin E and posttranscriptional up-regulation of p27Kip1. *Blood* 2002;99:2199-206.
- Doggrell SA & Wanstall JC. Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition. *Cardiovasc Res* 2004;61:653-62.
- Dolle L, Adriaenssens E, El Yazidi-Belkoura I, Le Bourhis X, Nurcombe V & Hondermarck H. Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:463-70.
- Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH & Kinet JP. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor  $\alpha$ -chain gene. *Cell* 1993;75:969-76.
- Douer D, Ramezani L, Parker J & Levine AM. All-trans-retinoic acid effects the growth, differentiation and apoptosis of normal myeloid progenitors derived from purified CD34+ bone marrow cells. *Leukemia* 2000;14:874-81.
- Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Arch Anat Physiol* 1879;3:166-69.

- Enerback L. Mucosal mast cells in the rat and in man. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;82:249-55.
- Fenaux P, Chomienne C & Degos L. Treatment of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:153-74.
- Forsythe P & Ennis M. Clinical consequences of mast cell heterogeneity. *Inflamm Res* 2000;49:147-54.
- Fritsch P & Vanscheidt W. Flowzytometrie in der Dermatologie. *Hautarzt* 1996;47:561-78.
- Frossard N, Freund V & Advenier C. Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004;500:453-65.
- Fung-Leung WP, Thurmond RL, Ling P & Karlsson L. Histamine H4 receptor antagonists: the new antihistamines? *Curr Opin Investig Drugs*. 2004;5:1174-83.
- Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, et al. Identification of mutations in the coding region of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 1993;92:1736-44.
- Galli SJ, Maurer M & Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999;11:53-59.
- Galli SJ & Wershil BK. The two faces of the mast cell. *Nature* 1996;381:21-2.
- Geiger T, Andus T, Klapproth J, Hirano T, Kishimoto T & Heinrich PC. Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur J Immunol* 1988;18:717-21.
- Goli M & Brown S. HPLC method for quantification of 13-cis retinoic acid (13-cis ra) subjected to light and heat treatments. *Mississippi Academy of Sciences (MAS)*. (Accessed April 20, 2005, at <http://www.msacad.org/showabstracts/?id=206>)
- Gollnick HP & Krautheim A. Topical treatment in acne: current status and future aspects. *Dermatology* 2003;206:29-36.
- Grabbe J, Welker P, Dippel E & Czarnetzki BM. Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Arch Dermatol Res* 1994;287:78-84.
- Groneberg DA, Serowka F, Peckenschneider N, et al. Gene expression and regulation of nerve growth factor in atopic dermatitis mast cells and the human mast cell line-1. *J Neuroimmunol* 2005;161:87-92.
- Grutzkau A, Kruger-Krasagakes S, Baumeister H, et al. Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell* 1998;9:875-84.

- Gudas LJ, Sporn MB & Roberts AB. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: Sporn MB, Roberts BS, Goodman DS, eds. The retinoids: biology, chemistry, and medicine. New York, USA: Raven Press, 1994:443-520.
- Guhl S, Hartmann K, Tapkenhinrichs S, et al. Ultraviolet irradiation induces apoptosis in human immature, but not in skin mast cells. *J Invest Dermatol* 2003;121:837-44.
- Hakimi J, Seals C, Kondas J, Pettine L, Danho W & Kochan J. The  $\alpha$  subunit of the human IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI) is sufficient for high affinity IgE binding. *J Biol Chem* 1990;265:22079-81.
- Hamann K, Grabbe J, Welker P, Haas N, Algermissen B & Czarnetzki BM. Phenotypic evaluation of cultured human mast and basophilic cells and of normal human skin mast cells. *Arch Dermatol Res* 1994;286:380-5.
- Harris P & Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 1985;37:407-22.
- Hart PH, Bonder CS, Balogh J, Dickensheets HL, Donnelly RP & Finlay-Jones JJ. Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13. *J Leukoc Biol* 1999;66:575-8.
- Hasegawa S, Pawankar R, Suzuki K, et al. Functional expression of the high affinity receptor for IgE (Fc $\epsilon$ RI) in human platelets and its' intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood* 1999;93:2543-51.
- Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M & Nishikawa S. Identification of the control regions for mouse c-kit gene transcription induced by retinoic acid. *DNA Res* 1995;2:211-18.
- Heinrich MC & Corless CL. Gastric GI stromal tumors (GISTs): the role of surgery in the era of targeted therapy. *J Surg Oncol* 2005;90:195-207.
- Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M & Babina M. Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol* 2001;10:1-10.
- Herault O, Domenech J, Degenne M, et al. All-trans-retinoic acid up-regulates CD38 but not c-Kit antigens on human marrow CD34<sup>+</sup> cells without recruitment into cell cycle. *Br J Haematol* 1998;103:343-50.
- Hjertson M, Kivinen PK, Dimberg L, Nilsson K, Harvima IT & Nilsson G. Retinoic acid inhibits in vitro development of mast cells but has no marked effect on mature human skin tryptase- and chymase-positive mast cells. *J Invest Dermatol* 2003;120:239-45.
- Holgate ST, Church MK & Kapp A. Allergologie. München: Urban & Fischer, 1996.

- Humphries DE, Wong GW, Friend DS, et al. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* 1999;*400*:769-72.
- Huntley JF. Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. *J Comp Pathol* 1992;*107*:349-72.
- Irani AM, Nilsson G, Miettinen U, et al. Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. *Blood* 1992;*80*:3009-21.
- Irani AM & Schwartz LB. Human mast cell heterogeneity. *Allergy Proc* 1994;*15*:303-8.
- Ishida S, Kinoshita T, Sugawara N, Yamashita T & Koike K. Serum inhibitors for human mast cell growth: possible role of retinol. *Allergy* 2003;*58*:1044-52.
- Iwakiri R, Inokuchi K, Dan K & Nomura T. Marked basophilia in acute promyelocytic leukaemia treated with all-trans retinoic acid: molecular analysis of the cell origin of the basophils. *Br J Haematol* 1994;*86*:870-72.
- Jablonowski JA, Carruthers NI & Thurmond RL. The histamine H4 receptor and potential therapeutic uses for H4 ligands. *Mini Rev Med Chem* 2004;*4*:993-1000.
- James SY, Williams MA, Kelsey SM, Newland AC & Colston KW. The role of vitamin D derivatives and retinoids in the differentiation of human leukaemia cells. *Biochem Pharmacol* 1997;*54*:625-34.
- Jensen BM, Dissing S, Skov PS & Poulsen LK. A Comparative Study of the FcεRI Molecule on Human Mast Cell and Basophil Cell Lines. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;*137*:93-103.
- Jutel M, Watanabe T, Akdis M, Blaser K & Akdis CA. Immune regulation by histamine. *Curr Opin Immunol* 2002;*14*:735-40.
- Kallen KJ, Galle PR & Rose-John S. New developments in IL-6 dependent biology and therapy: where do we stand and what are the options? *Expert Opin Investig Drugs* 1999;*8*:1327-49.
- Kambe M, Kambe N, Oskeritzian CA, Schechter N & Schwartz LB. IL-6 attenuates apoptosis, while neither IL-6 nor IL-10 affect the numbers or protease phenotype of fetal liver-derived human mast cells. *Clin Exp Allergy* 2001;*31*:1077-85.
- Kambhampati S, Verma A, Li Y, Parmar S, Sassano A & Plataniias LC. Signalling pathways activated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2004;*45*:2175-85.

- Kanbe N, Kurosawa M, Miyachi Y, Kanbe M, Saitoh H & Matsuda H. Nerve growth factor prevents apoptosis of cord blood-derived human cultured mast cells synergistically with stem cell factor. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1113-20.
- Kastner P, Mark M & Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: What are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 1995;83:859-69.
- Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Ann Rev Immunol* 1999;17:931-72.
- Kinoshita T, Koike K, Mwamtemi HH, et al. Retinoic acid is a negative regulator for the differentiation of cord blood-derived human mast cell progenitors. *Blood* 2000;95:2821-28.
- Kinoshita T, Sawai N, Hidaka E, Yamashita T & Koike K. Interleukin-6 directly modulates stem cell factor-dependent development of human mast cells derived from CD34(+) cord blood cells. *Blood* 1999;94:496-508.
- Kirshenbaum AS, Akin C, Wu Y, et al. Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcεRI or FcγRI. *Leukemia Res* 2003;27:677-82.
- Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Foster B, Scott LM & Metcalfe DD. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34+, c-kit+, and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood* 1999;94:2333-42.
- Kitamura Y, Go S & Hatanaka S. Decrease of mast cells in W/W V mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 1978;52:447-52.
- Kitamura Y & Hirotab S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2924-31.
- Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N & Matsuda H. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci* 1993;306:185-91.
- Klinke R & Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart: Thieme Verlag Stuttgart, 2003.
- Kreutz M, Fritsche J, Ackermann U, Krause SW & Andreesen R. Retinoic acid inhibits monocyte to macrophage survival and differentiation. *Blood* 1998;91:4796-802.
- Kruger-Krasagakes S, Moller A, Kolde G, Lippert U, Weber M & Henz BM. Production of interleukin-6 by human mast cells and basophilic cells. *Invest Dermatol* 1996;106:75-9.

- Lad SP, Neet KE & Mufson EJ. Nerve growth factor: structure, function and therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003;2:315-34.
- Lambiase A, Micera A, Sgrulletta R, Bonini S & Bonini S. Nerve growth factor and the immune system: old and new concepts in the cross-talk between immune and resident cells during pathophysiological conditions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:425-30.
- Lawson ND & Berliner N. Neutrophil maturation and the role of retinoic acid. *Exp Hematol* 1999;27:1355-67.
- Lora JM, Al-Garawi A, Pickard MD, et al. FcεRI-dependent gene expression in human mast cells is differentially controlled by T helper type 2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1119-126.
- Lorentz A & Bischoff SC. Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL-4. *Immunol Rev* 2001;179:57-60.
- Lorentz A, Schwengberg S, Sellge G, Manns MP & Bischoff SC. Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *J Immunol* 2000;164:43-48.
- Lorigados-Pedre L & Bergado-Rosado J. Nerve growth factor in neurodegeneration and neurorestorative therapy. *Rev Neurol* 2004;38:957-71.
- Maden M & Hind M. Retinoic acid in alveolar development, maintenance and regeneration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004;359:799-808.
- Maden M. The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *Proc Nutr Soc* 2000;59:65-73.
- Malaviya R & Georges A. Regulation of mast cell-mediated innate immunity during early response to bacterial infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002;22:189-204.
- Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 1992;6:329-44.
- Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA & Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990;345:224-9.
- Matikainen S & Hurme M. Comparison of retinoic acid and phorbol myristate acetate as inducers of monocytic differentiation. *Int J Cancer* 1994;57:98-103.
- Maurer M, Theoharides T, Granstein RD, et al. What is the physiological function of mast cells? *Exp Dermatol* 2003;12:886-910.

- Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, et al. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 2004;432:512-6.
- Metcalf DD, Baram D & Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997;77:1033-79.
- Mitsui H, Furitsu T, Dvorak AM, et al. Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:735-9.
- Moya-Garcia AA, Medina MA & Sanchez-Jimenez F. Mammalian histidine decarboxylase: from structure to function. *Bioessays* 2005;27:57-63.
- Mueller TD, Zhang JL, Sebald W & Duschl A. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:237-50.
- Nagpal S & Chandraratna RA. Vitamin A and regulation of gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1:341-6.
- Nakahata T, Tsuji K, Tanaka R, et al. Synergy of stem cell factor and other cytokines in mast cell development. In: Kitamura Y, Yamamoto S, Galli SJ, eds. *Biological and Molecular Aspects of Mast Cell and Basophil Differentiation and Function*. New York, USA: Raven Press, 1995:13-24.
- Nilsson G, Blom T, Kusche-Gullberg M, et al. Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scand J Immunol* 1994a;39:489-98.
- Nilsson G, Miettinen U, Ishizaka T, Ashman LK, Irani AM & Schwartz LB. Interleukin-4 inhibits the expression of Kit and tryptase during stem cell factor-dependent development of human mast cells from fetal liver cells. *Blood* 1994b;84:1519-27.
- Nilsson G & Nilsson K. Effects of interleukin (IL)-13 on immediate-early response gene expression, phenotype and differentiation of human mast cells. Comparison with IL-4. *Eur J Immunol* 1995;25:870-73.
- Nishimoto N & Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:386-91.
- Nwankwo JO. Anti-metastatic activities of all-trans retinoic acid, indole-3-carbinol and (+)-catechin in Dunning rat invasive prostate adenocarcinoma cells. *Anticancer Res* 2002;22:4129-35.
- Olsson IL & Breitman TR. Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents. *Cancer Res* 1982;42:3924-27.

- Oskeritzian CA, Wang Z, Kochan JP, et al. Recombinant human (rh)IL-4-mediated apoptosis and recombinant human IL-6-mediated protection of recombinant human stem cell factor-dependent human mast cells derived from cord blood mononuclear cell progenitors. *J Immunol* 1999;**163**:5105-15.
- Otsuki T, Sakaguchi H, Hatayama T, Wu P, Takata A & Hyodoh F. Effects of all-trans retinoic acid (ATRA) on human myeloma cells. *Leuk Lymphoma* 2003;**44**:1651-6.
- Payne V & Kam PC. Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* 2004;**59**:695-703.
- Petkovich M, Brand NJ, Krust A & Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987;**330**:444-50.
- Petkovich PM. Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 2001;**45**:136-42.
- Petruska JC & Mendell LM. The many functions of nerve growth factor: multiple actions on nociceptors. *Neurosci Lett* 2004;**361**:168-71.
- Piao YF, Shi Y & Gao PJ. Inhibitory effect of all-trans retinoic acid on human hepatocellular carcinoma cell proliferation. *World J Gastroenterol* 2003;**9**:2117-20.
- Pittenger G & Vinik A. Nerve growth factor and diabetic neuropathy. *Exp Diabetes Res* 2003;**4**:271-85.
- Purton LE, Bernstein ID & Collins SJ. All-trans retinoic acid delays the differentiation of primitive hematopoietic precursors (lin-c-kit+Sca-1+) while enhancing the terminal maturation of committed granulocyte/monocyte progenitors. *Blood* 1999;**94**:483-95.
- Purton LE, Bernstein ID & Collins SJ. All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. *Blood* 2000;**95**:470-77.
- Reed CE & Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**114**:997-1008.
- Ronnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci* 2004;**61**:2535-48.
- Rook GA, Hernandez-Pando R, Dheda K & Teng Seah G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol* 2004;**25**:483-8.
- Rote Liste® Service GmbH. Roteliste 2005. Aulendorf: ECV Editio Cantor Verlag, 2005.
- Ryan JJ, DeSimone S, Klisch G, et al. IL-4 inhibits mouse mast cell FcεRI expression through a STAT6-dependent mechanism. *J Immunol* 1998;**161**:6915-23.
- Saatcioglu F, Claret FX & Karin M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin Cancer Biol* 1994;**5**:347-59.



- Saito H, Ebisawa M, Sakaguchi N, et al. Characterization of cord-blood-derived human mast cells cultured in the presence of Steel factor and interleukin-6. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;107:63-5.
- Sammons J, Ahmed NA, Khokher MA & Hassan HAT. Mechanisms mediating the inhibitory effect of all-trans retinoic acid on primitive hematopoietic stem cells in human long-term bone marrow. *Stem Cells* 2000;18:214-19.
- Schechter NM, Brass LF, Lavker RM & Jensen PJ. Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1998;176:365-73.
- Scheffold A & Kern F. Recent developments in flow cytometry. *J Clin Immunol* 2000;20:400-7.
- Schoeler D, Grützkau A, Henz BM, Küchler J & Krüger-Krasagakis S. Interleukin-6 enhances whereas tumor necrosis factor alpha and interferons inhibit integrin expression and adhesion of human mast cells to extracellular matrix proteins. *J Invest Dermatol* 2003;120:795-801.
- Scholl PR & Geha RS. Physical association between the highaffinity IgG receptor (Fc $\gamma$ RI) and the  $\gamma$  subunit of the high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ ). *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8847-50.
- Schwartz LB. Clinical utility of tryptase levels in systemic mastocytosis and associated hematologic disorders. *Leukemia Res* 2001;25:553-62.
- Shimamoto Y, Suga K, Yamaguchi M, Kuriyama K & Tomonaga M. Prophylaxis of symptoms of hyperhistaminemia after the treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid. *Acta Haematol* 1994;92:109-12.
- Shimizu Y, Ashman LK, Du Z & Schwartz LB. Internalization of Kit together with stem cell factor on human fetal liver-derived mast cells: new protein and RNA synthesis are required for reappearance of Kit. *J Immunol* 1996;156:3443-9.
- Shiohara M & Koike K. Regulation of mast cell development. *Chem Immunol Allergy* 2005;87:1-21.
- Shore PA. The chemical determination of histamine. *Methods Biochem Anal* 1971;5:89-97.
- Silbernagel S & Lang F. *Taschenatlas der Physiologie*. Stuttgart: Thieme Verlag, 1998.
- Smith SJ, Ying S, Meng Q, et al. Blood eosinophils from atopic donors express messenger RNA for the alpha, beta, and gamma subunits of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) and intracellular, but not cell surface, alpha subunit protein. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:309-17.

- Smith W & Saba N. Retinoids as chemoprevention for head and neck cancer: where do we go from here? *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;55:143-52.
- Song L & Schindler C. IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2004;177:43-51.
- Sonoda Y. Interleukin-4 - a dual regulatory factor in hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 1994;14:231-40.
- Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, et al. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 2005;26:1-43.
- Steinke JW. Anti-interleukin-4 therapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004;24:599-614.
- Stryer L. Biochemie. 4.Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1996.
- Thienemann F, Henz BM & Babina M. Regulation of mast cell characteristics by cytokines: divergent effects of interleukin-4 on immature mast cell lines versus mature human skin mast cells. *Arch Dermatol Res* 2004a;296:134-38.
- Thienemann F, Guhl S, Rex C, et al. All-trans Retinoic Acid is Dedifferentiating to Human Mast Cells Independent of their Stage of Maturation. *J Invest Dermatol* 2004b;123:A6.
- Torii I, Morikawa S, Harada T & Kitamura Y. Two distinct types of cellular mechanisms in the development of delayed hypersensitivity in mice: requirement of either mast cells or macrophages for elicitation of the response. *Immunology* 1993;78:482-90.
- Toru H, Eguchi M, Matsumoto R, Yanagida M, Yata J & Nakahata T. Interleukin-4 promotes the development of tryptase and chymase double-positive human mast cells accompanied by cell maturation. *Blood* 1998;91:187-95.
- Toru H, Ra C, Nonoyama S, Suzuki K, Yata J & Nakahata T. Induction of the high-affinity IgE receptor (FcεRI) on human mast cells by IL-4. *Int Immunol* 1996;8:1367-73.
- Unger T & Li J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2004;5:7-10.
- Upham JW, Sehmi R, Hayes LM, Howie K, Lundahl J & Denburg JA. Retinoic acid modulates IL-5 receptor expression and selectively inhibits eosinophil-basophil differentiation of hemopoietic progenitor cells. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:307-13.
- Valent P, Bevec D, Maurer D, et al. Interleukin 4 promotes expression of mast cell ICAM-1 antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3339-42.

- Valent P, Spanblochl E, Sperr WR, et al. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood* 1992;80:2237-45.
- Watanabe T & Ohtsu H. L-histidine decarboxylase as a probe in studies on histamine. *Chem Rec* 2002;2:369-76.
- Watanabe T. Studies on histamine with L-histidine decarboxylase, a histamine-forming enzyme, as a probe: from purification to gene knockout. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2001;118:159-69.
- Weber A, Knop J & Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *Br J Dermatol* 2003;148:224-8.
- Weber S, Babina M, Krüger-Krasagakes S, Grützkau A & Henz BM. A subclone (5C6) of the human mast cell line HMC-1 represents a more differentiated phenotype than the original cell line. *Arch Dermatol Res* 1996;288:778-82.
- Weber S, Kruger-Krasagakes S, Grabbe J, Zuberbier T & Czarnetzki BM. Mast cells. *Int J Dermatol* 1995;34:1-10.
- Welker P, Grabbe J, Gibbs B, Zuberbier T & Henz BM. Nerve growth factor- $\beta$  induces mast-cell marker expression during in vitro culture of human umbilical cord blood cells. *Immunology* 2000;99:418-26.
- Welker P, Grabbe J, Grutzkau A & Henz BM. Effects of nerve growth factor (NGF) and other fibroblast-derived growth factors on immature human mast cells (HMC-1). *Immunology* 1998;94:310-7.
- Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997;61:233-45.
- Xia HZ, Du Z, Craig S, et al. Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fc $\epsilon$  receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells. *J Immunol* 1997;159:2911-21.
- Yee NS, Langen H & Besmer P. Mechanism of kit ligand, phorbol ester, and calcium-induced down-regulation of c-kit receptors in mast cells. *J Biol Chem* 1993;268:14189-201.
- Yu VC, Delsert C, Andersen B, et al. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 1991;67:1251-66.
- Zouboulis CC. Retinoids--which dermatological indications will benefit in the near future? *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14:303-15.

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Dr. Magda Babina für die immer vorhandene Gesprächsbereitschaft, die Klarheit, die sie immer wieder in das Thema gebracht hat und die vielen wertvollen Anregungen und Hinweise. Es war eine Betreuung, wie man sie sich besser nicht wünschen kann.

Ein besonderer Dank geht an Frau Professor Henz für die Überlassung des Themas, ihre hilfsbereite Unterstützung und konstruktive Kritik.

Ich danke auch den zahlreichen anonymen Patienten, die ihre Vorhautproben bereitstellten. Ohne ihr Zutun wäre die Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Dank auch den gesamten Mitarbeitern der Abteilung für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité und insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Professor Henz für ihre hilfreiche Unterstützung, die freundliche Einweisung in die Labore und das Interesse, das sie meiner Arbeit entgegengebracht haben. Dabei soll ein ganz besonderer Dank an Herrn Dipl.-Ing. Sven Guhl gehen.

Mein letzter Dank geht an meine Mutter und meine Schwester für das Vermitteln von Kenntnissen über das amtliche Regelwerk der Rechtschreibreform und an meinen Vater für die Hilfe im Hintergrund.

## Erklärung

„Ich, Friedrich Thienemann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: [Einfluss von all-*trans*-Retinsäure (ATRA) auf die Expression von Differenzierungsmarkern bei humanen Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 9. September 2005